

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN
GÉNICA ENTRE TUMORES DE ORIGEN
COLORRECTAL Y SUS CORRESPONDIENTES
METÁSTASIS HEPÁTICAS

TESIS DOCTORAL

MIRIAM LÓPEZ GÓMEZ

Directores de Tesis

Dr Jaime Feliu Batlle
Dra Paloma Cejas Guerrero

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN
GÉNICA ENTRE TUMORES DE ORIGEN
COLORRECTAL Y SUS CORRESPONDIENTES
METÁSTASIS HEPÁTICAS

Memoria presentada para la obtención del grado de Doctor en
Medicina por

Miriam López Gómez

Dirigida por el Doctor Jaime Feliu Batlle y la Doctora Paloma
Cejas Guerrero

Madrid, 2011

Dr. Jaime Feliu Batlle, Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz y Profesor Asociado de la Universidad Autónoma de Madrid, y

Dra. Paloma Cejas Guerrero, Doctora en Bioquímica e Investigadora contratada por el Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz.

Certifican:

Que Doña Miriam López Gómez ha realizado durante los últimos cuatro años bajo nuestra dirección el trabajo titulado “COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE TUMORES DE ORIGEN COLORRECTAL Y SUS CORRESPONDIENTES METÁSTASIS HEPÁTICAS” para optar al grado de Doctor en Medicina.

Estimamos que su trabajo es novedoso y original y reúne los requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser aceptado para su presentación.

Madrid, 5 de septiembre de 2011.

Dr. Jaime Feliu Batlle

Dra. Paloma Cejas Guerrero

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'J' followed by a long horizontal stroke.A handwritten signature in blue ink, featuring a circular loop followed by a long horizontal stroke.

A Pau, a Nerea
y a nuestra pequeña, a la que nunca olvidaremos.

AGRADECIMIENTOS

Desde pequeña siempre he sentido una profunda admiración por todas aquellas personas (desde personajes ilustres a compañeros de primaria) cuyo intelecto les ha permitido realizar logros importantes o alcanzar grandes metas. Con el paso de los años me he dado cuenta de que la inteligencia es mucho más amplia que el potencial cognitivo, y que el verdadero motor de nuestro aprendizaje está constituido por el esfuerzo y la constancia. Cuando uno de los dos falla, todo el mecanismo se desengrana.

El trabajo que os presento a continuación no es más que una tesis, como tantas otras que habréis visto publicadas, algunas peores, muchas otras infinitivamente mejores. Pero esta tesis es el resultado de un trabajo en el que he invertido mucha dedicación y esfuerzo. Lo he realizado con verdadera ilusión, he aprendido y he disfrutado mucho haciéndola. Ciertamente es que en su elaboración también ha habido periodos de desánimo y desorientación, como ocurre en cualquier proyecto que emprendemos. Esos momentos, como ocurre en la vida real, también son necesarios. Incrementan nuestra fortaleza y afianzan nuestro paso. Pero, sin duda, la elaboración de esta tesis me ha puesto de manifiesto una vez más el apoyo incondicional que recibo de muchas personas que están a mi lado en el día a día, tanto a nivel profesional como personal. Sin su ayuda y esfuerzo esta tesis no hubiera salido adelante.

Al Dr Jaime Feliu, director del proyecto, persona admirable por su infatigable labor docente e incansable actitud investigadora. Su constante labor pedagógica y sus consejos han sido las claves en el desarrollo de esta tesis. Él creyó en mí y me dio la oportunidad de formar parte de su equipo, lo cual ha determinado en gran parte mi trayectoria profesional.

A la Dra Paloma Cejas, por el enorme trabajo desarrollado en el laboratorio de biología molecular, base de esta tesis, su gran interés y contagioso entusiasmo a la hora de llevar a cabo los proyectos.

A la Prof Rosario Madero, por su meticulosidad en el análisis estadístico de los datos. Sin todo su empeño no habiéramos podido sacar tanta información. Su paciencia y sentido común han sido fundamentales en los momentos de desorientación y pesimismo.

Al Dr Enrique Casado, compañero y amigo, por su incondicional apoyo y comprensión a nivel personal y profesional durante estos cuatro años.

Al Dr Gonzalo Serralta, compañero y amigo del Hospital, por toda su ayuda y su tiempo en los momentos de mayor desánimo.

A nivel personal quiero dar las gracias a mi familia, fundamentalmente a Pau, por su apoyo constante a lo largo de tantos años y porque me ayuda a ser mejor persona cada día. A Nerea, nuestra pequeña, el mejor regalo que nos ha dado la vida. A mis padres y mis queridos hermanos, Yan y Sonia, quienes me han enseñado la importancia del esfuerzo, la humildad y el cariño, como los principales valores de la vida. A todos nuestros amigos, que nos acompañan siempre, algunos desde hace tantos años, en los momentos más felices y en los más tristes de nuestro camino. Y a gran parte del personal sanitario y no sanitario del Hospital Infanta Sofía (auxiliares, técnicos, enfermeras, médicos, personal de limpieza y cafetería...) por el respeto y el cariño que nos tenemos, que hace mucho más fácil el trabajo diario.

Y, finalmente, a nuestros pacientes, que cada día nos enseñan una lección de vida, y por los cuales merece la pena esforzarse, estudiar y mejorar. Porque gracias a ellos tenemos la suerte de poder ejercer la profesión más gratificante y hermosa de todas.

Índice

INTRODUCCIÓN	8
1 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA.....	9
2 FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DEL CÁNCER.....	11
2.1 Oncogenes	11
2.2 Genes microRNAs	13
2.3 Genes supresores de tumores	14
3 CARCINOGENÉISIS DEL CÁNCER COLORRECTAL	15
4 FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LAS METÁSTASIS HEPÁTICAS. CASCADA METASTÁSICA Y FACTORES IMPLICADOS.	22
5 ASPECTOS CLÍNICOS DEL CÁNCER COLORRECTAL.....	30
5.1 Epidemiología	30
5.2 Clínica	33
5.3 Diagnóstico y estadificación.....	35
5.4 Pronóstico.	40
5.5 Tratamiento.....	44
5.5.1.. Manejo de las metástasis hepáticas.....	50
6 FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA.....	56
6.1 Factores relacionados con el metabolismo de 5FU	56
6.2 Factores relacionados con el metabolismo del Oxaliplatino	58
6.3 Factores relacionados con el metabolismo del CPT-11	59
6.4 Factores relacionados con los fármacos anti-EGFR.	60
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
7 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	64
7.1 Hipótesis de trabajo.	64
7.2 Objetivos.	65
7.2.1.. Objetivo principal.	65

7.2.2.. Objetivos secundarios.	65
MATERIAL Y MÉTODO	67
8 MATERIAL Y MÉTODO	68
8.1 Características clínico-patológicas	68
8.1.1.. Criterios de inclusión.....	68
8.1.2.. Datos clínicos y anatomopatológicos.....	69
8.2 Selección de genes.....	71
8.3 Selección de sistemas pronósticos tras la resección de metástasis hepáticas.....	73
8.4 Procesamiento de las muestras	75
8.4.1.. Aislamiento del ARN total.	76
8.4.2.. Síntesis del ADN complementario	76
8.4.3.. Reacción de PCR cuantitativa.....	77
8.4.4.. Análisis mutacional	77
8.4.5.. Análisis inmunohistoquímico.	78
8.5 Análisis estadístico.....	80
8.5.1.. Estadística descriptiva.	80
8.5.2.. Comparación de perfiles de expresión.....	80
8.5.3.. Normalización de Ct.....	80
8.5.4.. Análisis del valor pronóstico de las variables y evaluación de los sistemas pronósticos previos.	81
8.5.5.. Análisis de la correlación mutacional.....	82
RESULTADOS.....	83
9 RESULTADOS.....	84
9.1 Características clínico-patológicas del total de la muestra	84
9.2 Características clínico-patológicas y diferencias de expresión génica de los pacientes con identificación de genes en el tumor primario y en la metástasis hepática.	88
9.3 Análisis de la vía EGFR	94
9.3.1.. Concordancia del estado mutacional de KRAS.....	94
9.3.2.. Concordancia del resto de marcadores (Tabla: 11)(Figura: 14).....	94
9.3.3.. Combinación de marcadores	96
9.4 Evaluación de los sistemas pronósticos para SLEy SG tras la resección de metástasis hepáticas	97
9.5 Evaluación de factores pronósticos en nuestra muestra	107

DISCUSIÓN	110
10 DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS	111
10.1 Elección del perfil génico.....	111
10.2 Procesamiento y análisis de los genes.	112
10.3 Técnica de qRT-PCR.	113
11 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	118
11.1 Genes relacionados con el metabolismo de fármacos: Timidilato Sintasa (TS), Dihidropirimidin Deshidrogenasa (DPD) y Timidin Fosforilasa (TP).	118
11.2 Citoquinas.....	126
11.3 Marcadores angiogénicos	129
11.4 Oncogenes/Genes supresores de tumores.....	133
11.5 Moléculas de adhesión	135
11.6 Marcadores de apoptosis.....	140
11.7 Telomerasa.....	144
11.8 Moléculas de la vía EGFR	145
11.9 Factores pronósticos tras resección hepática	149
CONCLUSIONES	153
12 CONCLUSIONES	154
RESUMEN.....	156
13 RESUMEN	157
CLAVES DE LAS ABREVIATURAS	159
14 CLAVES DE LAS ABREVIATURAS	160
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS	163
15 COMUNICACIÓN TIPO PÓSTER EN ASCO 2009	164
16 COMUNICACIÓN TIPO PÓSTER EN ASCO 2010	165
17 COMUNICACIÓN TIPO PÓSTER EN SEOM 2009	166
18 COMUNICACIÓN ORAL SEOM 2011	167

19 PUBLICACIÓN EN REVISTA INTERNACIONAL	168
20 TRABAJOS ACEPTADOS PENDIENTES DE PUBLICACIÓN	174
REFERENCIAS.....	175
21 REFERENCIAS	176

Lista de Tablas

Tabla: 1	Sistema de estadificación TNM del CCR. (7ª ed AJCC, 2010)	38
Tabla: 2	Parejas de genes determinados mediante PCR	72
Tabla: 3	Sistemas de estadificación pronóstica tras la resección de metástasis hepáticas.....	74
Tabla: 4	Parejas de oligonucleótidos empleados en las amplificaciones.....	78
Tabla: 5	Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos.....	85
Tabla: 6	Datos relacionados con el manejo de las metástasis hepáticas	86
Tabla: 7	Características clínico-patológicas de los pacientes con identificación génica en el primario y en la metástasis (n=32).....	88
Tabla: 8	Estudio comparativo entre las parejas de genes	90
Tabla: 9	Diferencia de expresión génica entre la metástasis y la tumoración primaria	90
Tabla: 10	Estudio de correlación entre las expresiones de los genes estadísticamente significativos.	92
Tabla: 11	Alteraciones en los tumores con KRAS nativo.	96
Tabla: 12	Análisis de supervivencia de Kaplan Meier con cuatro variables	98
Tabla: 13	Análisis de supervivencia de Kaplan Meier con cinco variables.....	99
Tabla: 14	Regresión de Cox multivariante para SG (negro) y SLE (azul)	101
Tabla: 15	Análisis de supervivencia de Kaplan Meier	102
Tabla: 16	Análisis multivariante mediante Regresión de Cox	103
Tabla: 17	Estudio de regresión de Cox univariante para supervivencia	104
Tabla: 18	Estudio de regresión de Cox multivariante para supervivencia.....	105
Tabla: 19	Estudio de regresión de Cox univariante para supervivencia	106
Tabla: 20	Estudio de regresión de Cox multivariante para supervivencia.....	106
Tabla: 21	Variables con valor pronóstico para SLE estadísticamente significativo en el análisis univariante.....	108
Tabla: 22	Variables con valor pronóstico para SLE estadísticamente significativo en el análisis multivariante.	108
Tabla: 23	Variables con valor pronóstico para SG estadísticamente significativo en el análisis univariante.....	109
Tabla: 24	Series con análisis de concordancia de genes entre primario y metástasis	115
Tabla: 25	Series de concordancia de los genes relacionados con la vía EGFR.....	117

Lista de Figuras

Figura: 1	Principales rutas genéticas en la carcinogénesis Colorrectal.....	16
Figura: 2	Cascada metastásica.....	23
Figura: 3	Angiogénesis tumoral	27
Figura: 4	Incidencia mundial del CCR.....	30
Figura: 5	Supervivencia global a los 5 años	42
Figura: 6	Metabolismo del 5 FU	57
Figura: 7	Mecanismo de acción del Oxaliplatino	59
Figura: 8	Mecanismo de acción del Irinotecán	60
Figura: 9	Cascada de señalización de EGFR	61
Figura: 10	Meses de seguimiento tras la cirugía hepática	87
Figura: 11	Meses de supervivencia tras la cirugía hepática.....	87
Figura: 12	Gráficos Box-Plot de los genes con diferencia estadísticamente significativa	91
Figura: 13	Gráficos de correlación de las expresiones génicas estadísticamente significativas	93
Figura: 14	Muestras en inmunohistoquímica de la tinción de EGFR, pAKT y PTEN.....	97
Figura: 15	Distribución lineal de supervivencia con la suma de cuatro variables	99
Figura: 16	Distribución lineal de supervivencia con la suma de cinco variables	100
Figura: 17	Distribución lineal de supervivencia.	103

INTRODUCCIÓN

1 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA.

El Cáncer Colorrectal (CCR) constituye la segunda causa de muerte en el mundo occidental, causando unas 51.370 muertes al año y presenta una incidencia de 102.900 casos nuevos (Jemal A et al 69-90). En España se diagnostican cerca de 25.600 nuevos casos al año y constituye la segunda causa de muerte por cáncer en varones y la tercera en mujeres. (López-Abente, G. et al. 165-173). A pesar de los avances en el diagnóstico precoz, el 40% de los pacientes desarrollarán metástasis a lo largo de su enfermedad, siendo el hígado el principal órgano afectado (Penna and Nordlinger 1075-xi).

La selección de los esquemas de tratamiento más adecuados continúa siendo un reto, puesto que carecemos de factores pronósticos (factores que se correlacionan con la supervivencia) y predictivos (marcadores que predicen la respuesta a una terapia particular) fiables. Estos factores no tienen por qué ser los mismos en la enfermedad localizada que en la metastásica, puesto que el desarrollo de las metástasis es un proceso dinámico en el que se produce una serie de cambios en el genotipo tumoral. Este diferente perfil génico condiciona además el variado perfil de resistencias farmacológicas observado en las distintas fases de la enfermedad.

En la actualidad numerosos estudios intentan identificar marcadores bioquímicos o moleculares fiables que puedan emplearse para predecir la respuesta a la quimioterapia. Estos factores predictivos son fundamentales para individualizar el tratamiento en función del fenotipo molecular del tumor en cada paciente. Generalmente el tratamiento de la enfermedad metastásica se realiza en función de los hallazgos moleculares encontrados en el tumor primario. Sin embargo,

desconocemos si el perfil de expresión génica del tumor primario es equivalente al de la metástasis, y si los cambios de expresión que se producen a nivel molecular en el proceso de metastatización pueden modificar la sensibilidad a los tratamientos quimioterápicos actuales.

Por ello, cabe pensar que la realización de un análisis comparativo entre los perfiles de expresión del primario y de la metástasis en el CCR puede aportar más información sobre los cambios moleculares que experimentan las células tumorales en el proceso de metastatización. Además, nos puede ayudar a dilucidar hasta qué punto es válida la estrategia de utilizar las alteraciones moleculares presentes en el tumor primario para decidir el tratamiento a realizar en la enfermedad metastásica.

2 FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DEL CÁNCER

El cáncer es una patología producida por una serie de alteraciones en los **oncogenes, genes supresores de tumores y genes microRNAs**. Estas alteraciones suelen ser mutaciones somáticas puntuales, aunque generalmente un simple cambio genético no es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno y éstos suelen ser el resultado de un proceso multifactorial (Croce 502-11).

2.1 Oncogenes

Activación de los oncogenes. Los oncogenes codifican proteínas que regulan la proliferación celular, la apoptosis o ambas funciones. Pueden activarse como consecuencia de reagrupamientos cromosómicos, mutaciones o amplificaciones de genes. Las mutaciones y las translocaciones suelen ser alteraciones iniciales, mientras que la amplificación suele ocurrir en estadios más avanzados de la carcinogénesis.

Todo esto puede alterar la estructura o la expresión del oncogén, lo cual puede conferir a las células una mayor supervivencia y crecimiento (Bishop 235-48).

Mutaciones. Cuando un oncogén se activa por una mutación se incrementa la actividad de la proteína que codifica. Las mutaciones de mayor relevancia en el CCR son las mutaciones en la familia RAS (KRAS, HRAS, NRAS) (Rodenhuis 241-47).

Amplificación de genes. Generalmente suelen ocurrir durante la proliferación del tumor. El segmento de DNA amplificado suele implicar varias kilobases y puede contener numerosos genes. Las familias de oncogenes más frecuentemente amplificadas son MYC, EGFR, RAS y ciclina D1.

Reagrupamientos cromosómicos. Las traslocaciones e inversiones cromosómicas son alteraciones citogenéticas que pueden aumentar o desregular la transcripción de los oncogenes.

Productos de los oncogenes. Los productos de los oncogenes pueden clasificarse en seis grupos: factores de transcripción, remodeladores de la cromatina, factores de crecimiento, receptores de factores del crecimiento, transductores de la señalización y reguladores de la apoptosis.

Factores de transcripción. Son miembros de una familia de multigenes que comparten dominios estructurales. Para actuar requieren interacción con otras proteínas.

Reguladores de la cromatina. Modificaciones en el grado de compactación de la cromatina juegan un papel importante en el control de la expresión, replicación y reparación de la segregación cromosómica. Existen dos enzimas remodeladoras de la cromatina: enzimas dependientes de ATP y enzimas que modifican el extremo N Terminal de las histonas (Jenuwein and Allis 1074-80). Suele deberse a un proceso epigenético que determina la interacción entre los nucleosomas y las proteínas relacionadas con la cromatina (Strahl and Allis 41-45).

Factores de crecimiento. Son un conjunto de moléculas cuya función no sólo es la de estimular la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis, sino también el mantener la supervivencia celular, estimular la migración celular, la diferenciación celular y la apoptosis. Entre ellos se encuentra el Factor de Crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, en inglés), el factor de

crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, en inglés), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y los factores estimulantes (Eritropoyetina, trombopoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos...).

Receptores de los factores de crecimiento. Son las zonas de unión de los factores de crecimiento. En el CCR adquieren especial relevancia el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3.

Transductores de la señalización. Cuando un ligando se une a los receptores éstos se reorganizan y se produce la autofosforilación de las tirosinas en la porción intracelular de las moléculas (Pawson and Warner 1268-75). Estas tirosinas constituyen los denominados transductores de la señalización. Numerosos oncogenes codifican estas proteínas, produciendo alteraciones en el posterior crecimiento celular.

Reguladores de la apoptosis. Hay dos grandes vías que conducen a la muerte celular programada: la vía extrínseca, gracias a receptores (**FAS** y el **Factor de necrosis tumoral alfa**) que reciben señales proapoptóticas desde el exterior y la vía intrínseca o mitocondrial mediante las proteínas de la familia **Bcl-2**.

2.2 Genes microRNAs

A diferencia de otros genes implicados en el cáncer estos genes no codifican proteínas. Estos genes originan una banda de RNA simple de entre 21 y 23

nucleótidos cuya función es regular la expresión génica. Estas moléculas pueden unirse a un RNA mensajero (RNAm) originando tanto su degradación como la de la proteína que codifica. Su función depende por lo tanto del tejido al cual vayan dirigidos, pudiendo comportarse como un gen supresor de tumores si su diana es un oncogén o como un oncogén si su diana es un gen supresor de tumores. Juegan un papel importante como bio-marcadores diagnósticos y terapéuticos en el cáncer.

2.3 Genes supresores de tumores

Estos genes se encuentran en las células sanas y sus productos inhiben la proliferación celular excesiva. Una mutación o delección en los mismos hace que pierdan su función actuando como oncogenes. Algunos genes supresores de tumores codifican proteínas reguladoras de la transcripción, otros la progresión del ciclo celular. En el CCR adquiere relevancia especial los genes supresores de la vía Wnt.

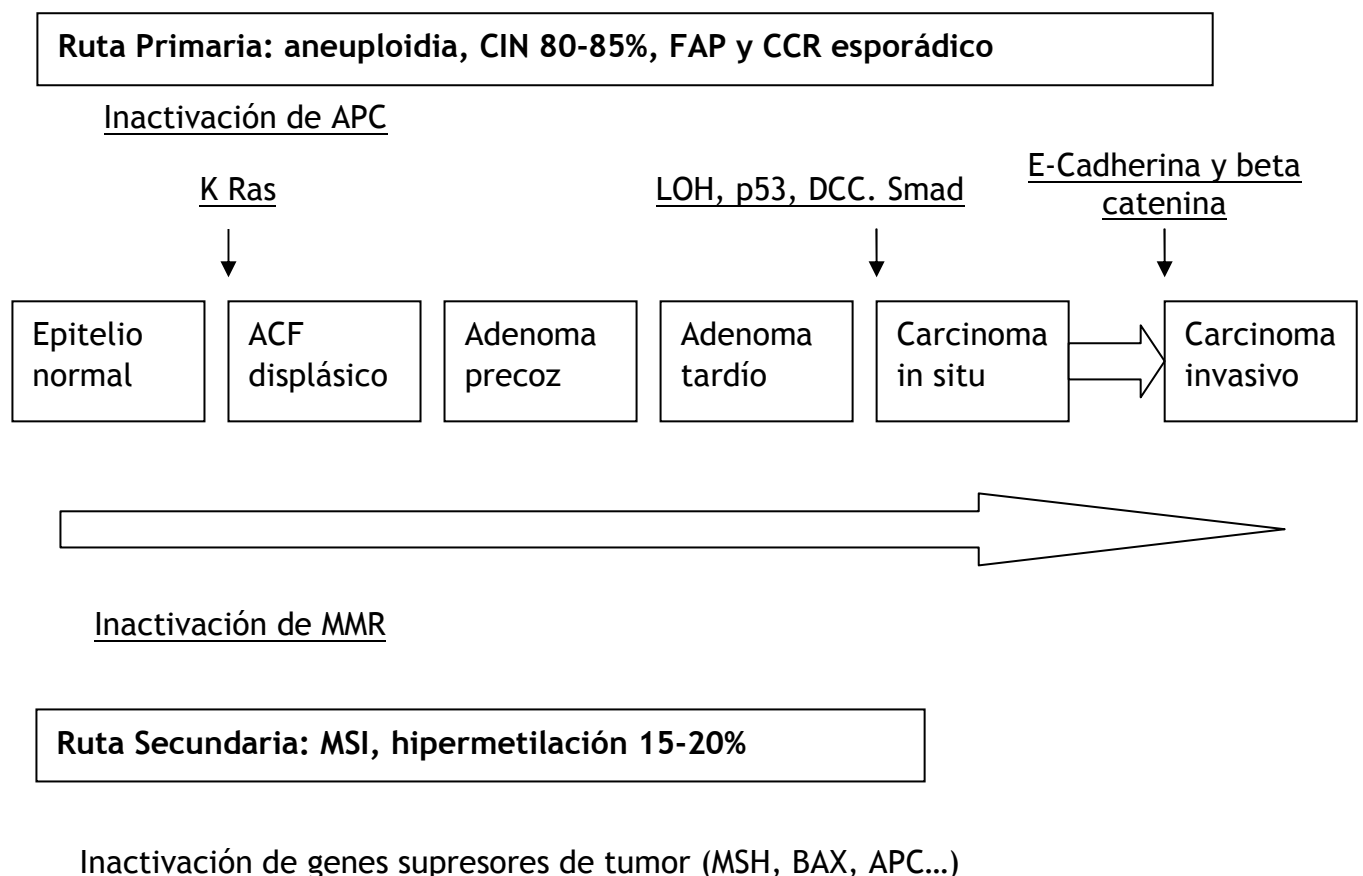
3 CARCINOGENESIS DEL CÁNCER COLORRECTAL

La mayoría de los CCR se originan a partir de adenomas (pólipos adenomatosos) displásicos. A su vez, estos pólipos se originan cuando se interrumpen los mecanismos que regulan la proliferación celular (Stelzner 1048-55). En condiciones normales las células de la superficie del intestino se pierden continuamente hacia la luz por mecanismos de apoptosis celular y de exfoliación, y deben ser continuamente repuestas. La proliferación suele ocurrir en la base de las criptas, y una vez que alcanzan la superficie se inicia su diferenciación. Este proceso se ve alterado cuando los adenomas esporádicos y los pólipos hiperplásicos incrementan su tamaño mediante el proceso de fusión criptal, se vuelven displásicos y ocasionalmente adquieren potencial invasivo (Wong et al. 212-17).

En 1988, Vogelstein y colaboradores caracterizaron todos los eventos moleculares que ocurrían en los diferentes estadios patológicos asociados a procesos tumorales (Vogelstein et al. 525-32). En 1990, Fearon y Vogelstein demostraron que la mayoría de los CRC se desarrollan gracias a la secuencia de **adenoma a carcinoma**, mediante un proceso de carcinogénesis en varias etapas. (Fearon and Vogelstein 759-67). De acuerdo con su modelo, los CCR se desarrollan a partir de epitelio normal (en los denominados focos de criptas aberrantes o ACP) que posteriormente degeneran a lesiones precursoras benignas (adenomas o pólipos serrados), estadios avanzados de adenoma y finalmente carcinomas. Por ello, la extirpación de los adenomas reduce la incidencia de neoplasias invasivas (Citarda et al. 812-15).

A pesar de que la secuencia adenoma-carcinoma está bien establecida, hay una gran controversia alrededor de los mecanismos moleculares que la desencadenan (Figura: 1). Se cree que un grupo de células originan una serie de clones que presentan ciertas ventajas de crecimiento respecto al resto de células (Hoeijmakers 366-74). Este crecimiento puede adquirirse gracias a un incremento en la tasa de proliferación, a una alteración en la apoptosis o ambos. Además, el clon precanceroso debe desarrollar un ambiente celular “permisivo” para mutaciones futuras. Todo este proceso se denomina **INESTABILIDAD GENÓMICA**, y resulta crítica en el proceso de la carcinogénesis.

Figura: 1 Principales rutas genéticas en la carcinogénesis Colorrectal



APC: Adenomatosis Poliposis Coli. ACF: Focos de criptas aberrantes. CIN: Inestabilidad cromosómica. CCR: Cáncer Colorrectal. FAP: Poliposis Adenomatosa Familiar. HNPCC: Cáncer de colon hereditario no polipósico. LOH: pérdida de heterozigosidad. MSI: Inestabilidad de microsatélites. MMR: Mismatch Repair.
--

La integridad genómica de una célula normal se encuentra minuciosamente regulada. El ciclo celular y el huso mitótico son críticos para asegurar que la proliferación celular sea adecuada y que el material genético se organice de forma apropiada. Cuando se produce un daño genético demasiado grande para ser reparado, la célula impide que el DNA dañado se replique induciendo la apoptosis de dicha célula.

En el desarrollo del CCR intervienen dos procesos de inestabilidad genómica, la **INESTABILIDAD CROMOSÓMICA (CIN)** (acumulación de anomalías cromosómicas estructurales -aneuploidia- o numéricas) y la **INESTABILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES (MSI)** (falta de reparación de las bases perdidas durante la replicación del DNA), lo que origina discrepancias en el número de nucleótidos encontrados dentro de las regiones de microsatélites en el ADN tumorales y en el original. Ambas vías son excluyentes. Recientemente se ha propuesto una nueva vía que implica **FACTORES EPIGENÉTICOS**, relacionados con el desarrollo tumoral (Jass 398-405).

Inestabilidad Cromosómica También denominada *vía supresora*, es causa del 70-85% de los CCRs. El acúmulo de una serie de mutaciones independientes conduce a la proliferación ilimitada de un clon celular que originará un tumor maligno. La lesión inicial es el foco criptal displásico aberrante (ACF, en inglés), una lesión microscópica que precede el desarrollo del pólipo macroscópico. En esta vía están

implicadas mutaciones en APC (Adenomatous Polyposis Coli), mutaciones en el K-ras, pérdida de 18q y delección del 17p.

APC (5q21). Mutaciones en este gen (Adenomatous Polyposis Coli) originan alteraciones en la proteína APC, impidiendo la unión de ésta a las beta-cateninas. En condiciones normales la unión APC-beta catenina regula la señalización Wnt, encargada del crecimiento, la apoptosis y diferenciación celular (Cadigan and Liu 395-402). Cuando se producen alteraciones en el APC que interfieran con esta unión se originan alteraciones en esta señalización que convierten los ACFs esporádicos en adenomas tempranos.

K-ras (12p12). El protooncogén K-ras codifica una proteína GTP. Cuando se produce una mutación en esta proteína pierde su capacidad GTPasa, por lo que se interrumpe el paso de la GTP activa a GDP inactiva (Leslie et al. 845-60). Estas mutaciones ocurren en el 35-42% de los CCRs.

SMAD2, SMAD4 y DCC (18q21.1). Se origina la pérdida alélica de este cromosoma en un 60% de los CRC. El DCC codifica un receptor transmembrana que promueve la apoptosis, y SMAD2 y SMAD4 forman parte de la vía de señalización de TGFβ (Transforming growth factor beta). Las TGF-betas son citoquinas que se expresan en el colon y juegan un importante papel como supresores de tumores y promotores tumorales durante la carcinogénesis colorrectal, fundamentalmente en estadios tardíos (Denys et al. 263-74). Activan los fibroblastos del estroma promoviendo la angiogénesis y la expresión de moléculas de adhesión, lo que

origina un fenotipo más invasivo. Se desconoce su papel como factor pronóstico. (Bacman et al. 156).

Un componente de la superfamilia de TGF β es **Smad4**. Smad 4 es un gen supresor de tumores que a su vez activa Smad2 y Smad3 constituyendo complejos heterodímeros que penetran el núcleo de las células tumorales regulando su transcripción, transmitiendo la señalización proapoptótica. Las mutaciones de Smad4 impiden que realice esta función y suelen producirse en estadios tardíos de la carcinogénesis Colorrectal y su frecuencia se incrementa conforme el tumor desarrolla su potencial metastático (Woodford-Richens et al. 9719-23). Mutaciones en Smad4 se han correlacionado con la pérdida de la expresión de la E-cadherina, y mayor capacidad metastásica (Reinacher-Schick et al. 412-20).

p53 (17p13). La proteína p53 es un factor de transcripción importante encargada de detener el ciclo celular y dar tiempo al ADN para repararse en caso de que se produzca un daño. Las alteraciones en la p53 se producen por mutaciones o por pérdida de heterozigosidad (LOH, en inglés). La pérdida alélica de p53 suele ser un evento tardío en la carcinogénesis y generalmente supone la transición hacia una enfermedad invasiva. (Mills 2091-99).

La longitud de los telómeros y la actividad de la **telomerasa** también están implicados en el control de la capacidad proliferativa de las células tumorales (Harley et al. 307-15). Los telómeros son secuencias génicas localizadas al final de los cromosomas. En las células somáticas, se acortan progresivamente en cada ciclo celular debido a la pérdida de DNA. Este acortamiento ocasiona finalmente una

inestabilidad cromosómica, lo que conduce a la senescencia de estas células. Las células tumorales mantienen los telómeros gracias a la hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), lo que les permite proliferar de manera indefinida (Hiyama and Hiyama 643-49). Por ello, la actividad de la telomerasa está relacionada con la adquisición de un fenotipo invasor en el CCR. Las mutaciones que incrementan su actividad juegan un papel en el proceso multifactorial del desarrollo del CCR.

Inestabilidad de los microsatélites (MSI). Constituye el otro mecanismo principal de inestabilidad genómica en un 20% de CCR. En el cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC, en inglés) se encuentra presente hasta en un 60% de los tumores. Está basada en un fracaso del denominado “**mismatch repair**” (**MMR**). El sistema del Mismatch repair es el encargado de mantener la integridad del genoma, siendo sus proteínas más importantes la MLH1 y la MSH2. Sus funciones incluyen eliminar errores durante la replicación del ADN, vigilar el ADN dañado y evitar la recombinación entre secuencias no idénticas. La pérdida de la función del MMR puede originar un clon tumoral: las células que presentan un sistema MMR defectuoso desarrollan mutaciones en una tasa 1000 veces superior a la de las células normales. Estas mutaciones les confieren resistencia a la apoptosis y un incremento del potencial metastático.

Los genes del MMR pueden presentar mutaciones originadas en la línea germinal (como ocurre en el Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico, o síndrome de Lynch), o bien pueden inactivarse mediante la hipermetilación del promotor, (fenómeno epigenético). La inestabilidad de los microsatélites (MSI) (errores en la

replicación del DNA que no pueden ser reparados) es el fenotipo mutador de los tumores que presentan deficiencias en el sistema MMR.

En este sistema se interrumpe la reparación del ADN tras su replicación. Está compuesto por siete proteínas, siendo las más importantes hMLH1 y hMSH2 (Hatch et al. 2180-87). Los genes que codifican estas proteínas se encuentran mutados en casi todos los HNPCC y hasta en un 15% de los tumores esporádicos. Las células que presentan un déficit en el MMR comienzan a acumular errores en el ADN a lo largo de todo el genoma, fundamentalmente en los microsatélites. Una gran cantidad de microsatélites se encuentran presentes en genes implicados en la carcinogénesis, como el TGFR tipo II, el receptor del factor de crecimiento derivado de la insulina tipo II, Bax, Caspasa 5, MSH3, MSH6, beta-catenina, APC, y E2F4.

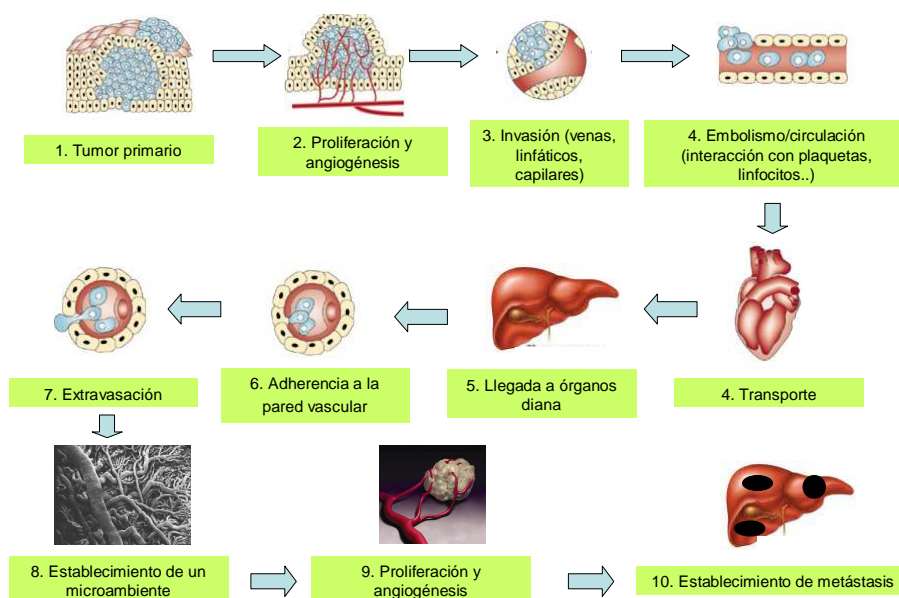
Cambios epigenéticos (Vía del fenotipo hipermetilador) Alteraciones epigenéticas como la metilación del ADN y una pérdida de la impronta génica pueden silenciar la expresión de ciertos genes, incluidos algunas enzimas del sistema del MMR (Das, PM. and Singal, R. 4632-42). Algunos tumores colorrectales presentan una alta frecuencia de metilación en la región CpG, son los denominados tumores con fenotipo hipermetilador en la región CpG (CIMP de sus siglas en inglés) (Weisenberger, DJ. et al. 787-93). Los tumores con este fenotipo están sometidos a una hipermetilación de la región promotora de las enzimas del sistema de MMR como MLH-1 y una silenciación de ciertos genes implicados en la carcinogénesis.

4 FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LAS METÁSTASIS HEPÁTICAS. CASCADA METASTÁSICA Y FACTORES IMPLICADOS.

Las metástasis hepáticas suponen la principal causa de muerte en los pacientes con CCR. Gracias a la determinación de los perfiles de expresión génica mediante microarrays, se ha mejorado el conocimiento de las vías moleculares responsables de la cascada metastásica. No obstante, todavía se desconoce gran parte de los mecanismos moleculares y celulares.

Para que se originen las metástasis a distancia, las células tumorales deben desligarse del tumor primario, invadir y migrar a través del estroma e introducirse en la circulación a través de los vasos linfáticos y venosos. Por allí circularán hasta que se adhieran a las células endoteliales, contacten con la matriz extracelular y se extravasen en los tejidos de alrededor, en este caso el parénquima hepático. Una vez allí, si el microambiente es el apropiado se iniciará el proceso de la neoangiogénesis (Bird, Mangnall, and Majeed 68-80) (Figura: 2)

Figura: 2 Cascada metastásica



La capacidad para metastatizar junto con la especificidad para que ésta ocurra en un órgano y no en otro podría estar determinada genéticamente, mediante lo que se denomina “firma genética”. El estudio de esta firma genética se ha realizado con microarrays, aunque hasta la fecha no se ha encontrado ningún perfil de expresión relacionado con las metástasis hepáticas.

Como alternativa a los microarrays para determinar los perfiles de expresión se pueden estudiar los genes que codifican las proteínas implicadas en los mecanismos de diseminación a distancia (adhesión celular, invasión, angiogénesis, crecimiento celular y supervivencia celular) (Neal et al. 1728-43).

1. Adhesión. La célula del tumor primario debe desligarse del resto de las células tumorales y adherirse al endotelio vascular para iniciar el proceso de diseminación. En este proceso juegan un papel muy importante la **Cadherina Epitelial** (e-

cadherina) y la **alfa-catenina**. La e-cadherina es una proteína encargada de mediar la unión intercelular y es fundamental en la invasión tumoral (Rudmik and Magliocco 347-59). El dominio intracelular de la e-cadherina forma un complejo con otras moléculas intracitoplasmáticas como la α -catenina y la β -catenina. Una alteración en la expresión del complejo e-cadherina/ β -catenina se ha asociado a desdiferenciación, invasión y metástasis en el CCR (Ikeguchi, Makino, and Kaibara 201-07).

2. Migración. El desarrollo de metástasis en el CCR no es un proceso aleatorio sino órgano-selectivo, siendo las citoquinas moléculas fundamentales en este proceso. Las citoquinas son factores solubles que atraen a células tumorales que sobreexpresan los receptores correspondientes (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle, and Roos 3833-39). Las citoquinas son moléculas de señalización, puesto que cuando se unen a sus receptores en las células diana se origina una cascada de señalización que finaliza en el crecimiento, adhesión y migración de las células tumorales. En el CCR adquieren especial relevancia **CXCR4** (y su ligando CXCL12) y **CCR6** (y su ligando CCL20). Una alta expresión de CXCR4 en los primarios de colon se relaciona con un mayor índice de metástasis hepáticas (Kim et al. 2744-53). CCL20 se expresa fundamentalmente en tejidos linfáticos y en el hígado, mientras que CCR6 se sobreexpresa en el tumor primario, generándose una quimiotaxis responsable de las metástasis hepáticas (Dellacasagrande et al. 534-44). Además, la sobreexpresión de CCR6 en el tumor primario se ha correlacionado con la presencia de metástasis hepáticas (Ghadjar et al. 1910-16).

3. *Invasión.* Para que las células adquieran su potencial invasivo se debe originar una degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular. Este proceso se produce gracias a unas enzimas denominadas proteasas. Entre ellas, las más relevantes son las **metaloproteasas (MMPs)** de la matriz extracelular, las **catepsinas** y los **activadores del plasminógeno**.

Las metaloproteasas (también denominadas colagenasas por ser las implicadas en la degradación del colágeno tipo IV) son producidas por una subpoblación de macrófagos localizadas en las células tumorales. Estas células tumorales junto con las células estromales forman un complejo celular que invade el tejido sano adyacente, para lo cual requiere la actividad proteolítica de las MMPs. En el CCR adquieren especial relevancia la MMP-7, MMP-9 y MMP-2 (Zeng and Guillem 575-82).

El activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA) se une al Receptor del activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPAR). Como consecuencia se aumenta la producción de plasmina que es capaz de degradar la matriz extracelular y activar las metaloproteasas. La sobreexpresión de estas moléculas se ha asociado al desarrollo de metástasis a distancia (Seetoo et al. 184-93) (Terada, Urano, and Konno 166-72). La combinación de niveles altos de uPAR y sobreexpresión de VEGF actúan de forma sinérgica para desarrollar las metástasis hepáticas del CCR (Konno et al. 516-23).

4. *Angiogénesis.* La angiogénesis es fundamental tanto para el crecimiento del tumor primario como para el desarrollo de las metástasis a distancia. Incrementa la posibilidad de que la célula entre en la circulación sanguínea y se disemine, y

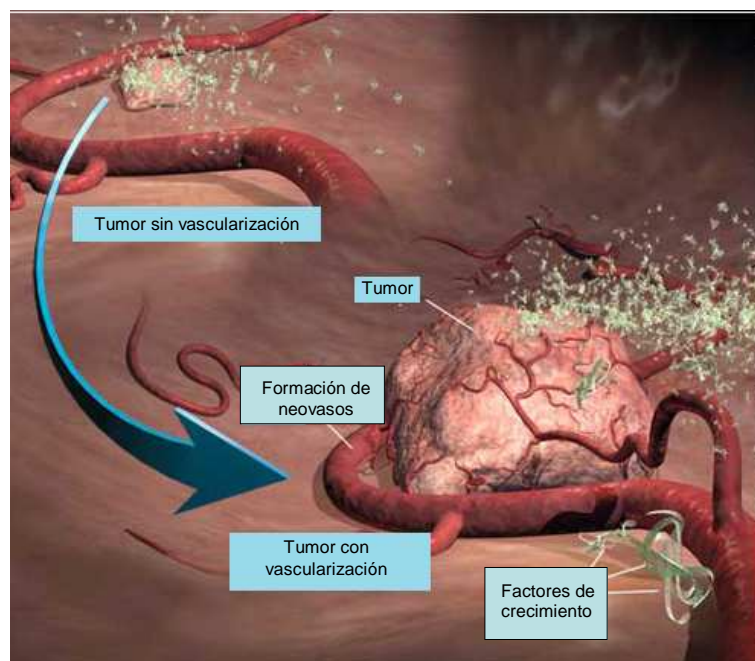
posteriormente promueve el crecimiento de las micrometástasis cuando se han depositado en el estroma. En el estroma debe existir un equilibrio entre factores pro-angiogénicos y antiangiogénicos que permita el desarrollo de las metástasis estimulando el crecimiento celular o incrementando la formación de los vasos sanguíneos (Figura: 3). El factor proangiogénico de mayor relevancia es el **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF en inglés)**, y el factor antiangiogénico la **trombospondina 1 (TSP-1)**.

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La angiogénesis es un proceso muy importante en la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis. En el CCR la creación de una nueva red de vascularización desde vasos preexistentes es un paso fundamental para el desarrollo de metástasis hepáticas (Kondo et al. 622-30). VEGF es una de las moléculas más importantes en este proceso, promoviendo la diferenciación del endotelio vascular, la proliferación y la migración celular (Beckner 594-623), por lo que altos niveles de VEGF se han relacionado con un mal pronóstico. Su función como mediador de la angiogénesis tumoral lo convierte en una diana terapéutica importante (Ellis and Hicklin 6371-75). Por ello, el grado de expresión de VEGF se podría convertir en un buen parámetro para medir la eficacia de los tratamientos dirigidos frente a VEGF.

Trombospondina 1 (TSP-1). La Trombospondina 1 (TSP-1) es una proteína de la matriz extracelular que modula la agregación plaquetaria, la actividad de las proteasas y funciones celulares como adhesión, motilidad y crecimiento celular (Lawler 1197-209). Puede promover la invasión tumoral dirigiendo la matriz extracelular (Sargiannidou, Zhou, and Tuszynski 726-33) pero también puede inhibir

el crecimiento tumoral uniéndose a los factores de crecimiento y las proteasas impidiendo que se digiera la matriz (Weinstat-Saslow et al. 6504-11). La función de la trombospondina en la angiogénesis y el crecimiento tumoral es muy controvertida. A pesar de que su función principal es antiangiogénica, su mecanismo exacto de actuación se desconoce y se cree que tiene efectos pro y antiangiogénicos, comportándose como una proteína reguladora en la neovascularización tumoral (Ren et al. 178-88).

Figura: 3 Angiogénesis tumoral



5 Crecimiento celular. Una vez que las micrometástasis se han depositado en el tejido hepático necesitan una serie de estímulos que promuevan su crecimiento, (factores de crecimiento). Estos factores se unen a sus receptores para ejercer su acción. En el CCR adquiere especial relevancia el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, en inglés), un miembro de la familia de

receptores tirosina quinasa Her-erbB. Una delección de su dominio extracelular, (una proteína transmembrana con actividad tirosin kinasa), puede originar una activación continua del receptor en ausencia de un ligando (Arteaga 3-9;Arteaga 31-39). Esta activación le permitirá fosforilar tirosinas localizadas en el dominio intracelular del receptor (RAS, BRAF, PIK3CA) lo cual a su vez activará nuevas cascadas de señalización intracelular que controlan el crecimiento celular, la diferenciación y apoptosis (Scaltritti, M. and Baselga, J. 5268-72).

6. Supervivencia celular. La alta incidencia de metástasis hepáticas en pacientes con CCR sugiere que el hígado proporciona un ambiente favorable para el desarrollo de metástasis. Pero para que el tejido metastático desarrolle la enfermedad a distancia, debe evadir el sistema inmunológico y reemplazar el tejido normal por tejido tumoral. El sistema inmunológico (fundamentalmente los mecanismos mediados por linfocitos) son muy importantes para controlar el crecimiento tumoral (Robbins and Kawakami 628-36). Sin embargo, se cree que el crecimiento de las metástasis hepáticas es posible gracias a una alteración de esta respuesta inmunológica (Yoong and Adams 1072-81). La mayoría de las células mononucleares (normalmente linfocitos T-killer) que infiltran las células metastásicas se encuentran en la periferia del tumor, entre el tumor y el tejido sano circundante, pero son incapaces de eliminar las células tumorales. Se ha hipotetizado que estas células metastásicas son capaces de inactivar los efectos antitumorales de los linfocitos (Takagi et al. 102-11). Uno de los mecanismos implicados en este proceso está mediado por el **ligando Fas (Fas-L)**, una molécula que pertenece a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral y que se

expresa en los linfocitos T-killer. Fas-L puede inducir la apoptosis uniéndose a su receptor (denominado Fas o APO-1/CD95). Los linfocitos también expresan Fas, por lo que las interacciones Fas/FasL entre los linfocitos pueden inducir su apoptosis (Nagata and Golstein 1449-56). Tanto en los tumores primarios de colon como en las metástasis hepáticas, las células tumorales son capaces de expresar Fas-L, ligando que se une a los receptores Fas expresados por los linfocitos induciendo su apoptosis, mecanismo que les permite evadir el sistema inmunológico (Strand et al. 1361-66) (Yoong et al. 693-703).

Otra molécula importante en la supervivencia celular es **Bax**. Forma parte de la familia Bcl-2 (formada por Bax, Bcl-2, Bcl-XL), y su función es determinar si las células deben sufrir el fenómeno de apoptosis. Bcl-2 inhibe la apoptosis y Bax la induce, por lo que se ha sugerido que el ratio Bax:Bcl-2 es importante para la supervivencia de las células tumorales (Crompton 414-19). En adenocarcinomas de colon estadios B y C, una alta expresión de Bax se relaciona con un mayor riesgo de recaída local (Giatromanolaki et al. 253-59). Durante el desarrollo de metástasis hepáticas se producen cambios en su expresión (Backus et al. 206-11).

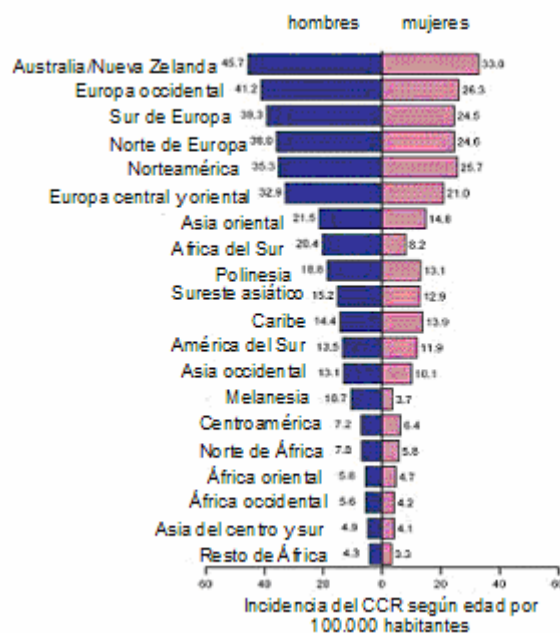
5 ASPECTOS CLÍNICOS DEL CÁNCER COLORRECTAL

5.1 Epidemiología

Incidencia y mortalidad. El CCR es el tercer cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres y el segundo en mujeres. En el 2008 se diagnosticaron 1.2 millones de casos nuevos y se produjeron 608.700 muertes. La mayor incidencia se encuentra en Australia y Nueva Zelanda, Europa y Norteamérica, siendo más frecuente en hombres que en mujeres (Jemal et al. 69-90) (Figura: 4)

En España en el año 2000 causó el 11% de defunciones en varones y el 15% en mujeres. El número de casos nuevos es de 21 000 en ambos sexos los cuales suponen 11 900 defunciones, con una edad media a la defunción de 70 años (López-Abente, G. et al. 165-173)

Figura: 4 Incidencia mundial del CCR



Lugar de presentación. Se ha producido un incremento del diagnóstico de los tumores del colon descendente, fundamentalmente los de ciego. (Kumar et al. 994-97), gracias al uso del rectosigmoidoscopio flexible, (Rabeneck et al.), que a su vez permite la polipectomía profiláctica. No obstante, no permite la visualización completa del colon, por lo que la colonoscopia continúa siendo el procedimiento diagnóstico de elección en pacientes con factores de riesgo (Schoenfeld et al. 2061-68).

Forma de presentación. El 80% de los CCR son esporádicos, mientras que el 20% restante son familiares, (desórdenes genéticos heredados de forma autosómica dominante que se asocian con un alto riesgo de desarrollar este tipo de tumor). Entre ellos, los más comunes son la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) (1-2%) y el Cáncer Colorrectal Hereditario no polipósico (HNPCC) (Lynch et al. 27-39). La FAP está originada por una serie de mutaciones en el gen APC (Adenomatosis Polyposis Coli), localizado en el cromosoma 5 que favorece el desarrollo de cientos/miles de pólipos antes de los 30 años. El HNPCC, más frecuente, se detecta en cerca del 2-6% del total de los adenocarcinomas de colon y está relacionado con defectos del “mismatch repair system” del DNA.

Factores de riesgo.

Edad. El 90% de los tumores CCR se diagnostican después de los 50 años y cerca del 12.5% por encima de los 85 años (Jemal et al. 43-66). Algunos estudios han encontrado una asociación entre la edad, el sexo femenino, la raza negra y la no

hispanica y la presencia de comorbilidad con una mayor probabilidad para desarrollar un tumor en colon proximal (Gonzalez et al. 251-58).

Alimentación y factores geográficos. El CCR tiene una mayor incidencia en países desarrollados, por lo que se piensa que la dieta y los factores medioambientales juegan un papel etiológico.

Tumores previos. Entre el 1.5 y el 3% de los pacientes sometidos a cirugía por un CCR o por pólipos adenomatosos desarrollarán un tumor metácrono en los primeros 5 años post cirugía (Balleste et al. 971-80).

Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn. Se ha documentado una asociación de la colitis ulcerosa con los tumores de colon, fundamentalmente los pacientes con pancolitis (incremento de riesgo 5-15 veces) (Pohl, Hombach, and Kruis 57-70). Ocurre lo mismo con la enfermedad de Crohn, cuyo diagnóstico suele ser más tardío y por lo tanto se relacionan con un peor pronóstico (Freeman 1810-11).

Diabetes Mellitus. La Diabetes tipo II se considera un factor de riesgo para el desarrollo de tumores de colon a nivel distal en los varones. Se cree que la hormona de crecimiento 1 (GH1) y el Factor de crecimiento insulín-like (IGF-1), juegan un papel importante en la diferenciación, proliferación y apoptosis celular (Bustin and Jenkins 447-54).

Colelitiasis y colecistectomía previa. La colelitiasis se relaciona con un mayor riesgo para el desarrollo de cáncer de colon proximal en mujeres (Oh et al. 56-61)

Los pacientes colecistectomizados también presentan un incremento del riesgo de desarrollar un CCR, debido al contacto entre los ácidos biliares y la mucosa colónica (Lagergren, Ye, and Ekblom 542-47).

Alcohol. Un consumo de alcohol por encima de 45 gr/dl aumenta el riesgo de desarrollar un CCR (Cho et al. 603-13). Se cree que el consumo de alcohol interfiere con la absorción de ácido fólico, lo cual puede originar una hipometilación del DNA (Su and Arab 111-19).

Factores protectores.

Entre los factores que han demostrado tener efectos protectores para el desarrollo del CCR (Janne and Mayer 1960-68) están las dietas ricas en fibra, frutas y vegetales, el ácido fólico, el calcio y el magnesio. La aspirina y los AINES presentan un efecto beneficioso al inducir la apoptosis y disminuir el crecimiento de las células tumorales inhibiendo la COX-2. Los inhibidores selectivos de la COX-2 y los no selectivos reducen significativamente el riesgo de desarrollar un cáncer de colon (Harris, Beebe-Donk, and Alshafie 237).

5.2 Clínica

Clínica y localización. Los tumores colorrectales pueden dar sintomatología en función de la localización del primario (fundamentalmente dolor abdominal, alteraciones en el tránsito gastrointestinal, hematoquecia o melenas, astenia) y secundaria a las localizaciones de las metástasis a distancia (las más frecuentes son hepáticas, ganglionares, pulmonares y peritoneales). El CCR puede diseminarse a distancia por vía linfática o hematológica y a estructuras adyacentes por vía

transperitoneal. Su principal vía de drenaje es el sistema portal, por lo que el primer lugar de diseminación hematológica suele ser el hígado. El drenaje de los tumores con origen en el recto inferior desemboca directamente en la vena cava inferior sin atravesar la vena porta, por lo que pueden metastatizar directamente en los pulmones sin atravesar el hígado.

El colon está dividido en segmentos anatómicos (ciego, colon ascendente, ángulo hepático, colon transversal, ángulo esplénico, colon descendente, colon sigmoide y recto) lo cual permite una mejor clasificación de los tumores colorrectales. Normalmente se dividen en **proximales**, cuando están por encima de la flexura esplénica (ciego, colon ascendente y colon transversal) y **distales** (localizados en colon descendente, colon sigmoide, unión recto-sigmoidea y en recto). Ambos tipos de tumores no sólo tienen una forma de presentación y una clínica diferente (dolor abdominal y síndrome constitucional en el caso de los tumores proximales y hematoquecia en los distales) sino que se cree que los mecanismos patogénicos son también distintos (Gervaz et al. 227-32; Gervaz et al. 364-72). Generalmente los tumores proximales se presentan en un estadio más avanzado (relacionado con un diagnóstico más tardío) y suelen tener un peor pronóstico.

Aparición temporal.

-Los tumores síncronos (dos o más primarios en el colon separados por tejido de características normales) suponen entre el 2 y el 10% de los pacientes con CCR. Su incidencia es mucho más frecuente en los casos de HNPCC. Por ello, la realización de una colonoscopia preoperatoria completa es imprescindible para identificar

pólipos o tumores síncronos que puedan ser extirpados. En el caso de tumores estenosantes que impidan su realización preoperatoria, debe realizarse intraoperatoriamente o inmediatamente después de la cirugía del primario (Kim and Park 4108-11).

-Los tumores metácronos (nuevos tumores no anastomóticos que se originan tras los seis meses del diagnóstico inicial) se desarrollan entre el 1.5 y el 3% durante los primeros 5 años postoperatorios. Los pacientes con un tumor localizado en el colon proximal presentan el doble de riesgo de desarrollar un tumor metacrono (Gervaz et al. 227-32).

5.3 Diagnóstico y estadificación

Diagnóstico e histología. La mayoría de los tumores de colon son adenocarcinomas endoluminales, por lo que la **colonoscopia** es la mejor técnica diagnóstica. Permite visualizar todo el colon, biopsiar lesiones, detectar neoplasias síncronas y realizar polipectomías terapéuticas. En las últimas décadas ha adquirido gran importancia la colonografía-TAC (también denominada colonoscopia virtual), un método no invasivo que permite visualizar todo el colon usando TC helicoidal. No obstante, no permite realizar polipectomías y su sensibilidad es inferior a la de la colonoscopia (Macari and Bini 819-33).

Más del 98% de los tumores de colon son **adenocarcinomas**. Estos se clasifican histológicamente según el grado de diferenciación de las estructuras glandulares. De ellos, entre el 11 y el 17% son adenocarcinomas mucinosos (productores de mucina), localizados fundamentalmente en colon distal y recto. Un 1-2% están

formados por células en anillo de sello: carcinomas no formadores de glándulas en las que la mucina desplaza el núcleo hacia la superficie, más agresivos y con mayor tendencia a la diseminación. Un 10% de los tumores mal diferenciados presentan focos de diferenciación neuroendocrina, y los localizados a nivel distal pueden contener áreas de diferenciación escamosa, denominándose adenoescamosos.

Estadificación.

-Tomografía Axial Computarizada (TAC): útil para detectar la extensión regional tumoral, linfática, las metástasis a distancia y las complicaciones locales. Su sensibilidad para detectar metástasis a distancia es mayor (75-85%) que para detectar afectación linfática local (45-73%) o la profundidad de la invasión transmural (50%).

-Resonancia Magnética con contraste (RNM): puede identificar más lesiones hepáticas que las visualizadas en la TAC y, en el caso de tumores rectales, es fundamental para visualizar la infiltración de la fascia mesorectal.

-La Tomografía por Emisión de (PET): no ha demostrado ser superior a la TAC como estadificación preoperatoria (Furukawa et al. 1007-11), aunque sí tiene un papel importante en el seguimiento con elevación del CEA en ausencia de recidiva radiológica en la TAC (Flamen et al. 862-69).

La necesidad de una estadificación preoperatoria mediante TAC es controvertida. Su uso sólo modifica el procedimiento quirúrgico en un pequeño número de casos (McAndrew and Saba 205-08). Por el contrario, la Ecografía Intraoperatoria (IOUS) es fundamental para una correcta estadificación de la enfermedad hepática y

presenta una sensibilidad de casi el 98% (Cervone, Sardi, and Conaway 611-15). Su alta sensibilidad para detectar nódulos hepáticos (superior al TAC con contraste) y modifica el procedimiento quirúrgico en numerosas ocasiones (Milsom et al. 44-49). Actualmente es la técnica de elección previa a la intervención quirúrgica hepática (Cohen, Machado, and Herman 206-12).

-Estudio histológico. A pesar de que los resultados radiológicos, endoscópicos y los hallazgos intraoperatorios pueden usarse para determinar un estadio clínico se requiere un examen histológico de la pieza quirúrgica.

El sistema de estadificación inicial fue introducido por Dukes y modificado por Astler y Collier. Este sistema se ha modificado por el sistema TNM propuesto por la American Joint Commission on Cancer (AJCC) (Edge et al p 43), de gran importancia pronóstica, puesto que el estadio patológico tumoral constituye el indicador más importante de la evolución tumoral. La clasificación del 2010 incluye una serie de cambios comparada con la del 2002 (Tabla: 1):

- Se clasifican las lesiones T4 en T4a (el tumor perfora la superficie del peritoneo visceral) y T4b (el tumor invade se adhiere a otros órganos o estructuras)
- Se clasifican los estadios II en IIA (T3N0), IIB (T4aN0) y IIC (T4bN0)
- Las categorías N1 y N2 se subdividen en función de los ganglios afectados.
- Los depósitos satélites tumorales localizados a continuación del tumor (región pericólica, fascia perirectal o mesenterio) pero sin evidencia de afectación ganglionar se clasifican como N1c.

- M1 se subdivide en M1a en el caso de un sitio único de metástasis y M1b en el caso de metástasis múltiples

Por lo tanto, los hallazgos radiológicos, endoscópicos e intraoperatorios se usan para designar un estadio clínico (cT, cN, cM), mientras que el estadio patológico requiere un examen histopatológico (pT, pN, pM). La completa estadificación patológica tras la cirugía se designa como ypT, ypN.

Tabla: 1 Sistema de estadificación TNM del CCR. (7ª ed AJCC, 2010)

Tumor primario (T)	
TX	El tumor primario no puede determinarse
T0	Ausencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: invasión de la lámina propia
T1	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la muscularis propia
T3	El tumor invade a través de la muscularis propia en los tejidos pericólorrectales
T4a	El tumor penetra la superficie del peritoneo visceral
T4b	El tumor invade o se adhiere hacia órganos o estructuras adyacentes
Ganglios linfáticos regionales (N)♦	
NX	No se pueden determinar la afectación de los ganglios linfáticos regionales
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
N1a	Metástasis en 1 ganglio linfático
N1b	Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos
N1c	Depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos no peritonealizados o perirrectales sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
N2	Metástasis in cuatro o más ganglios linfáticos regionales
N2a	Metástasis in 4-6 ganglios linfáticos regionales

N2b	Metástasis in 7 o más ganglios linfáticos regionales.
Metástasis a distancia (M)	
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia
M1a	La metastasis se encuentra confinada en un órgano (hígado, pulmón, ovario, nódulo linfático no regional...)
M1b	Metástasis en más de un órgano/lugar o en el peritoneo

Estadios anatómicos/Grupos pronósticos					
Estadio	T	N	M	Dukes	MAC
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Cualquier T	Any N	M1a	-	-
IVB	Cualquier T	Any N	M1b	-	-

5.4 Pronóstico.

Edad. Los pacientes jóvenes presentan supervivencias más cortas por la mayor frecuencia en esta población de tumores mucinosos, pobremente diferenciados o anaplásicos; simultáneamente en esta población se diagnostican más tumores en estadios avanzados (III y IV). No obstante, no se han objetivado diferencias de supervivencia a los cinco años respecto a los pacientes mayores (O'Connell et al. 558-62).

Localización tumor primario. Las lesiones localizadas en el hemicolon derecho suelen presentar una evolución más favorable que los localizados en sigma y en recto. Este mejor pronóstico se relaciona con la presencia de inestabilidad de microsatélites encontrada en tumores proximales (Gervaz, Bucher, and Morel 261-66). Los tumores del colon transversal suelen diagnosticarse en estadios avanzados (20-40% debutan como T4) y en un 30-50% de los casos presentan complicaciones como perforación, fistulización u obstrucción (Le, Mehtari, and Billey 285-93). Además, estos tumores presentan dificultades quirúrgicas para la resección ganglionar y el reestablecimiento del tránsito GI lo que les confiere un pronóstico particularmente desfavorable.

Forma de presentación. Los tumores que debutan como obstrucción o como perforación (15% del total) presentan una mayor tasa de mortalidad postoperatoria y una menor supervivencia (McArdle, McMillan, and Hole 483-88). En el caso de tumores obstructivos, el peor pronóstico radica en el estadio más avanzado en el que suelen diagnosticarse. La menor supervivencia de estos pacientes se atribuye a la mayor tasa de recurrencia a distancia (Carraro et al. 243-50). Por el contrario se

desconoce el impacto en la supervivencia de los tumores que debuten con perforación. Las perforaciones pueden producirse en el mismo tumor debido a una necrosis del mismo o en el colon proximal secundario a la distensión producida por tumores obstructivos. La cirugía de urgencia sí se relaciona con un peor pronóstico y una mayor tasa de mortalidad en los 30 días tras la cirugía, pero transcurrido el periodo post-operatorio, la supervivencia de este grupo de pacientes es similar a la de los pacientes sometidos a cirugía electiva (Smothers et al. 24-30) (McArdle and Hole 605-09)

Otros Factores pronósticos. A pesar de que el estadio histológico constituye el factor pronóstico más importante (O'Connell, Maggard, and Ko 1420-25; O'Connell et al. 558-62), existen otros parámetros pronósticos independientes. El Colegio de Patólogos Americanos (CAP, en inglés) evaluó el papel pronóstico de diversas variables biológicas, genéticas, moleculares e histológicas (Compton et al. 1739-57). Se agruparon en cuatro categorías en función de la evidencia científica. Dentro de ellos resaltaremos los factores pronósticos de la categoría I (su evidencia ha sido probada en estudios clínicos robustos) y los de la categoría IIA (factores muy estudiados que han demostrado tener un valor pronóstico o predictivo aunque no están validados en estudios clínicos robustos).

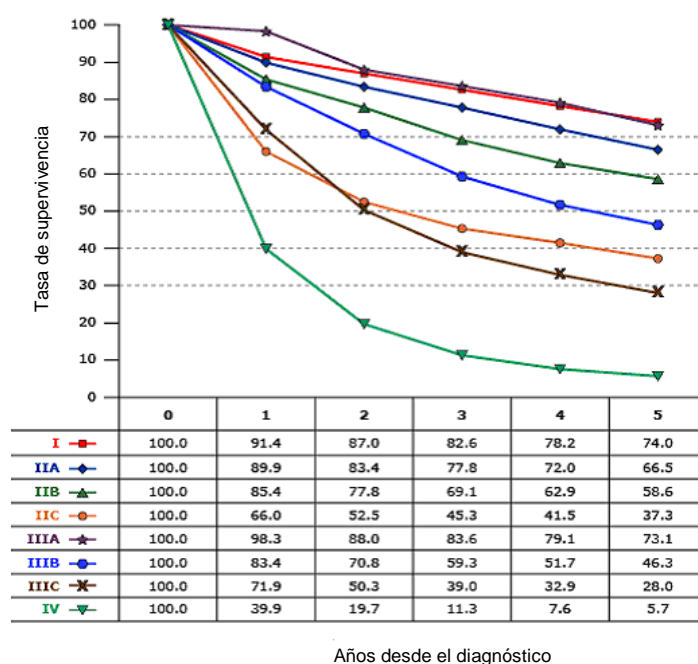
CATEGORÍA I

Extensión local del tumor. La profundidad de la penetración del tumor (T) influye independientemente en la supervivencia (Tominaga et al. 403-08). La afectación

serosa (peritoneal) también constituye un factor pronóstico adverso (Shepherd, Baxter, and Love 1096-102)

Afectación ganglionar. La invasión de los ganglios linfáticos regionales constituye el factor pronóstico más importante tras la resección quirúrgica, después de la presencia de metástasis. El número de los nódulos linfáticos con infiltración tumoral constituye uno de los principales predictores de respuesta, como lo recoge la clasificación TNM del 2010 (Chen and Bilchik 602-10) (Figura: 5) .

Figura: 5 Supervivencia global a los 5 años



Además del número de ganglios infiltrados, el número total de ganglios resecados en la cirugía influye directamente en el pronóstico de los tumores en estadios II y III, y se relaciona directamente con la supervivencia (Chang et al. 433-41). El empleo del Ratio de Nódulos Linfáticos (LNR, en inglés) que cuantifica el número de nódulos linfáticos positivos entre el número total de nódulos resecados

constituye un factor pronóstico riguroso (Wang et al. 1600-08), siendo un buen predictor de supervivencia (Schumacher et al. 827-31).

Nódulos mesentéricos (N1c). La presencia de estos depósitos tumorales constituye un factor de mal pronóstico (Goldstein and Turner 2228-38).

Invasión vascular. La invasión linfovascular predice un incremento del riesgo de recurrencia local y a distancia. (Michelassi et al. 11-18).

Invasión perineural. La afectación de los plexos se relaciona con tumores de mayor estadio y más indiferenciados, por lo que constituye un factor de mal pronóstico tanto para supervivencia global como para supervivencia libre de enfermedad. (Liebig. et al. 5131-7)

Tumor residual. Los pacientes con resección incompleta del tumor presentan una supervivencia a 10 años inferior a la de los pacientes sometidos a una resección completa (Willett et al. 242-47).

Recientemente Mlecnik y colaboradores (Mlecnik et al. 610-18) han demostrado que la presencia de células T en regiones tumorales específicas (conocido como **Invasión linfoide peritumoral**) puede utilizarse para predecir la recurrencia y la supervivencia en pacientes con tumores en estadios localizados. De esta forma, el crecimiento del tumor primario y la diseminación metastásica se relacionan con una disminución de la densidad de células T inmunes.

Niveles de CEA (Antígeno Carcinoembrionario). Los niveles de CEA por encima de 5.0 ngr/ml están relacionados con una peor supervivencia independientemente del

estadio tumoral (Wolmark et al. 375-82). Niveles prequirúrgicos elevados de CEA que no se normalizan tras la cirugía son un signo de persistencia de enfermedad.

CATEGORÍA IIA

Grado tumoral Es un reflejo del grado de diferenciación tumoral y por lo tanto constituye un factor pronóstico independiente (Newland et al. 2076-82)

Margen circunferencial (radial). Corresponde a la superficie no peritonealizada disecada quirúrgicamente. Cuando la distancia entre el extremo del tumor más próximo y dicho margen es inferior a 1 mm se considera positivo y se relaciona con una mayor recurrencia local.

Regresión tumoral tras quimioterapia neoadyuvante (clasificación ypTNM) Válido para los tumores de recto, cuanto mayor sea este grado de regresión tumoral mejor pronóstico presentarán los pacientes (Rodel et al. 8688-96).

5.5 Tratamiento

En este apartado nos centraremos únicamente en los fármacos actuales empleados para el cáncer de colon metastático.

El manejo actual del cáncer de colon metastático emplea varios fármacos activos, (5FU/LV, capecitabina, irinotecán, oxaliplatino, bevacizumab, cetuximab y panitumumab). El empleo de estos fármacos en combinación incrementa tanto la tasa de respuestas como el número de pacientes que posteriormente podrán ser sometidos a una resección curativa de las metástasis a distancia (Kelly and Goldberg 4553-60).

- Durante varias décadas el 5 Fluorouracilo y el Leucovorín (5FU-LV) constituyeron los únicos fármacos activos en el CCR metastático.
- La superioridad de FOLFOX (Oxaliplatino, 5 Fluorouracilo y Leucovorín) frente al 5FU-LV convencional quedó demostrada en el ensayo de de Gramont (de Gramont et al. 2938-47). La combinación mostraba un aumento en tasa de respuestas y en el tiempo de progresión.
- De manera similar el esquema FOLFIRI (Irinotecán, 5 Fluorouracilo y Leucovorín) demostró que la adición del CPT-11 al esquema tradicional con 5 FU-Leucovorín producía un aumento en supervivencia (Rougier et al. 1407-12).

Las dudas acerca de la mejor secuencia en la administración de los fármacos (secuencial versus concomitante) quedaron resueltas con los estudios FOCUS (Koopman et al. 135-42) y CAIRO (Seymour et al. 143-52). Estos estudios concluían que la administración concomitante presenta una mayor eficacia pero no se relaciona con aumento de supervivencia.

El orden de administración de los fármacos (FOLFOX seguido de FOLFIRI o viceversa) no modifica las tasas de respuesta ni de tiempo hasta la progresión, siendo preferible que el paciente reciba todas las líneas de tratamiento posibles (Tournigand et al. 229-37) (Colucci et al. 4866-75). De este modo, el empleo secuencial de los tres fármacos en algún momento de la enfermedad incrementa la mediana de supervivencia (Grothey et al. 1209-14).

- La Capecitabina, profármaco oral del 5 FU, tiene un papel fundamental en el CCR metastático. Se ha demostrado la no inferioridad del esquema XELOX

(Capecitabina, 5FU/LV) frente a regímenes de FOLFOX tanto en primera como en segunda línea metastásica(Cassidy et al. 2006-12). En cambio FOLFIRI es superior a XELIRI (Xeloda-CPT-11) tanto en eficacia como en seguridad (7.6 vs 5.7 meses respectivamente de TTP (Fuchs et al. 4779-86)

- El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal recombinante que va dirigido frente al factor de crecimiento derivado del endotelio. Su uso está aprobado en combinación con FOLFOX, XELOX y FOLFIRI. Su asociación con 5FU/LV está indicada únicamente en el caso de pacientes que no son capaces de tolerar el oxaliplatino/irinotecán (Hurwitz et al. 3502-08;Hurwitz et al. 3502-08) y el uso de Bevacizumab en monoterapia no está recomendado (Giantonio et al. 1399-403).

En el ensayo N016966 quedó establecido que la adición de Bevacizumab incrementa el tiempo libre hasta la progresión cuando se asocia al esquema XELOX o al FOLFOX (Cassidy et al. 2006-12). Los estudios TREE 1 y 2 han demostrado un aumento de tasa de respuesta y mejor tiempo hasta la progresión con la adición de Bevacizumab a los esquemas FOLFOX, XELOX y 5FU/LV en bolus (19.2 y 26 meses, 17.2 y 27 meses y 17.9 y 20.7 meses repectivamente) (Hochster et al. 3523-29)

La combinación de Bevacizumab con FOLFIRI, es superior a su combinación con IFL (CPT-11 y 5FU-LV administrado en bolus) o XELIRI (Xeloda-CPT-11) tanto en eficacia (incremento de hasta 9 meses el TTP) como en seguridad (Fuchs et al. 4779-86).

Recientemente, en el Congreso Internacional de Barcelona del 2011, se han comunicado los resultados de una nueva molécula, el antiVEGF-Trap (aflibercept®). Se trata de una proteína de fusión capaz de unirse a todas las isoformas del factor

de crecimiento derivado del endotelio vascular. Van Cutsem presentó los resultados de un estudio fase III. Se ha presentado un estudio fase III, el EFC 10262- VELOUR (www.clinicaltrials.gov) donde la combinación de antiVEGF-Trap con FOLFIRI en pacientes tratados previamente con un esquema basado en oxaliplatino producía una mejoría tanto de la supervivencia global (SG) (HR=0.817, IC 95.34%, 0.713-0.937, p=0.0032) como de la supervivencia libre de progresión (SLP) (HR=0.758, IC 99.99%, 0.578-0.995, p=0.00032).

-El Cetuximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico dirigido contra el dominio de unión al ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ejerciendo su efecto antitumoral mediante la antagonización del EGFR y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Su administración en monoterapia consigue una respuesta del 9% (Saltz et al. 1201-08), tasa que incrementa con las combinaciones:

- *Estudio BOND-1*: Cetuximab en combinación con irinotecán en pacientes tras progresión a tratamiento previo con CPT-11 duplica la tasa de respuestas (22.9% vs 10.8%, p= 0.007) (Cunningham et al. 337-45).

- *Ensayo fase III CRYSTAL*: Cetuximab junto con esquema FOLFIRI. Se consiguió un aumento de supervivencia libre de progresión (8.9 meses) y de tasa de respuestas (46.9%) (Van Cutsem et al. 1408-17).

- *Ensayo fase II Randomizado OPUS* (Bokemeyer et al. 663-71): La administración de Cetuximab en combinación con FOLFOX consigue una tasa de respuestas del 45.6%.

Otros estudios confirman el aumento de SLP y de SG con esta combinación (12 y 30 meses respectivamente en el estudio de Tabernero. (Tabernero et al. 5225-32).

El beneficio del tratamiento con Cetuximab queda limitado únicamente a los pacientes que presentan un K-Ras no mutado (tipo wild-type). Los tumores con K-ras mutado presentan una evolución peor en caso de recibir tratamiento con Cetuximab (de Reynies et al. 2228-30).

- El Panitumumab es un anticuerpo monoclonal completamente humanizado dirigido frente al mismo dominio del EGFR que el cetuximab.

Su empleo como monoterapia tras progresión a una terapia inicial aumentó las tasas de respuesta a un 10% frente al 0% que se conseguía únicamente con la mejor terapia de soporte, así como un aumento de SLP a 8 semanas (HR= 0,54; 95%, IC= 0,44-0,66) (Van Cutsem et al. 1658-64).

En combinación se han obtenido resultados importantes en primera y en segunda línea de tratamiento. En segunda línea se ha estudiado en combinación con fluorouracilo, leucovorín e irinotecán tras una primera línea de tratamiento (Peeters, M. et al 4706-4713) y la adición de bevacizumab demostró un incremento significativo de la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con KRAS wild type (HR=0.73, IC 95% CI, 0.59 a 0.90, p=0.004). También se observó una cierta tendencia no significativa hacia un aumento de la supervivencia global, [14.5 meses frente a 12.5 meses, HR=0.85, IC 95% 0.70 a 1.04, p=0.12). En primera línea de tratamiento se ha demostrado un aumento de la SLP en combinación con

fluorouracilo, leucovorín y oxaliplatino en los pacientes con tumores wild type (ensayo PRIME) (Douillard, J.Y. et al. 4697-4705)

La determinación del EGFR mediante inmunohistoquímica no ha demostrado tener un valor predictivo para determinar la probabilidad de respuesta a cetuximab (Cunningham et al. 337-45) ni a Panitumumab (Hecht et al. 980-88). En cambio, el empleo de estos fármacos sí debe limitarse a los pacientes que presenten tumores con k-ras tipo wild type (Amado et al. 1626-34; Van Cutsem et al. 1658-64). Los pacientes con k-ras mutado presentan una peor respuesta al tratamiento con panitumumab (Freeman et al. 184-90).

Merece la pena resaltar que muchos de los fármacos que han demostrado ser útiles en la enfermedad avanzada no han podido demostrar su eficacia en el tratamiento adyuvante. Ese es el caso del Irinotecán y de los anti-EGFR y anti-VEGF. En el Congreso Americano de Oncología Médica del 2010 se comunicó el resultado de un estudio donde la adición de cetuximab a FOLFOX 6 en estadios III no se asociaba con un beneficio clínico ni con un aumento de la supervivencia de los pacientes (Alberts SR et al. Abstr CRA 3507). El estudio AVANT puso de manifiesto que la adición de Bevacizumab a los regímenes estándar de quimioterapia adyuvante no incrementa el intervalo libre de progresión de estos pacientes (De Gramont, A. et al. Abstr 362). La adición de CPT-11 al tratamiento adyuvante ha obtenido resultados igual de desalentadores (ensayos CALGB 89803, ACCORD-02, y PETACC-3) (Van Cutsem, E. et al. Abstr 8, ASCO 2005). Se han propuesto varias hipótesis para explicar por qué fármacos tan eficaces en la enfermedad sistémica no han podido demostrar su eficacia en adyuvancia. A este respecto cabría hipotetizar que la

expresión génica puede variar a lo largo de la evolución de la enfermedad, y, de la misma manera, la sensibilidad de las células a los diferentes fármacos.

5.5.1 Manejo de las metástasis hepáticas

La combinación de cirugía y quimioterapia está aceptada para mejorar la supervivencia de los pacientes con metástasis hepáticas inicialmente irresecables. Los regímenes estándar de quimioterapia son combinaciones de 5 Fluorouracilo-Leucovorín (5 FU-LV) con oxaliplatino (esquema FOLFOX) o con irinotecán (esquema FOLFIRI). Estos regímenes consiguen disminuir el tumor y permitir la resección de entre un 9-40% de las metástasis hepáticas inicialmente irresecables (Nordlinger et al. 2037-2045) (Van Cutsem et al. 2212-2221). Gracias al empleo de estos fármacos, se ha conseguido una supervivencia a 5 años del 50% de los pacientes tras la resección hepática (Figueras et al. 478-488). Datos emergentes de ensayos clínicos aleatorizados sugieren que la adición de moléculas dirigidas, e incluso un tercer fármaco citotóxico, aumentan la efectividad de los tratamientos.

Sin embargo, actualmente no disponemos de un consenso único para el manejo de estos pacientes. El clínico puede enfrentarse a tres posibilidades diferentes: a) pacientes con enfermedad resecable de entrada; b) pacientes con metástasis hepáticas consideradas irresecables de entrada pero potencialmente resecables; c) pacientes con metástasis irresecables en las que el rescate quirúrgico posterior es muy poco probable.

Las posibilidades quirúrgicas han aumentando tanto en los últimos años que actualmente no existe una clara definición de resecabilidad, y cada paciente debe ser discutido en un Comité Interdisciplinar.

TRATAMIENTO NEOADYUVANTE (Quimioterapia de conversión)

Metástasis irresecables. El tratamiento de los pacientes con metástasis inicialmente irresecables debe basarse en la elección del régimen más efectivo en términos de tasa de respuesta y de supervivencia libre de enfermedad. La cirugía debe realizarse lo antes posible para minimizar los daños de los fármacos sobre el hígado. Puesto que la tasa de respuesta está relacionada con la tasa de resección (Folprecht et al. 1311-1319), entre los regímenes más adecuados disponemos de tres opciones: FOLFOX/FOLFIRI, cualquiera de ellos en combinación con un biológico [cetuximab (Nordlinger et al. 2037-2045), panitumumab (Van Cutsem et al. 2212-2221) bevacizumab (Saltz, LB. et al. 2013-2019)] o los tres fármacos citotóxicos (esquema FOLFOXIRI) en pacientes con buen performance status (Falcone et al. 1670-1676). FOLFOX y FOLFIRI han demostrado facilitar las resecciones hepáticas en pacientes seleccionados (Pozzo, C. et al. 933-939)(Alberts, SR. et al. 1-7). Sin embargo, en los últimos años existe un interés creciente por el empleo de la terapia de combinación de dos citotóxicos y un agente biológico. En el estudio fase III CRYSTAL (Van Cutsem et al. 1408-17) se demostró que la adición de cetuximab a FOLFIRI reducía el riesgo de progresión comparado con FOLFIRI sólo y además incrementaba la tasa de respuestas totales. Además, la tasa de cirugía con intención curativa fue mayor en el grupo de cetuximab. Tanto en el CRYSTAL como en el OPUS, que aleatorizaba a los pacientes

a recibir FOLFOX más cetuximab frente a FOLFOX sólo (Bokemeyer et al. 663-71), el cetuximab proporcionaba los mayores beneficios en pacientes con KRAS nativo. Otro fase II randomizado, el estudio CELIM, aleatorizaba a los pacientes a recibir cetuximab más FOLFOX6 o cetuximab más FOLFIRI. Se han comunicado tasas de respuestas del 85% y del 66% respectivamente (Folprecht G et al. Viii 168 -Abstr 510PD-). El 40% de los pacientes del grupo de FOLFOX6-cetuximab pudieron ser sometidos a resección (un 37% de las cuales pudieron ser R0) frente al 43% (35% de R0) del grupo de FOLFIRI-cetuximab. Por otro lado, el ensayo NO16966 compara la combinación de bevacizumab con FOLFOX/XELOX (Saltz, LB. Et al. 2013-2019). El bevacizumab incrementaba la supervivencia libre de enfermedad (9.4 frente a 8.0 meses, $p=0.0023$) y la tasa de resecciones R0 (6.3% frente a 4.9%), pero no tenía ningún efecto en la tasa de respuestas.

Finalmente, la combinación de los tres agentes citotóxicos (esquema FOLFOXIRI) incrementa significativamente la tasa de respuestas, la resección radical de las metástasis, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global comparado con FOLFIRI (Falcone, A. et al. 1670-1676).

En conclusión, en la actualidad no existe ningún regimen de quimioterapia superior al resto en combinación con agentes biológicos. El cetuximab es igual de efectivo en combinación con irinotecán o con oxaliplatino, y lo mismo ocurre con el bevacizumab. Sin embargo, en la actualidad, los beneficios de la asociación del cetuximab al oxaliplatino no están claros. En el Congreso ESMO del 2010 se presentaron los resultados del ensayo NORDIC en el que se comunicaba que la adición de Cetuximab al esquema FLOX (5 Fluorouracilo, Leucovorín y Oxaliplatino)

no mejoraba las tasas de respuestas, la supervivencia global ni la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes (Tveit KM et al. Abs LBA20) En el estudio COIN si se objetivó que el cetuximab incrementaba la tasa de respuestas pero no ha demostrado un beneficio en la supervivencia global o en la supervivencia libre de progresión en pacientes con KRAS wild type. A la vista de estos resultados el uso de Cetuximab actualmente no puede recomendarse en combinación con oxaliplatino o con capecitabina en primera línea de enfermedad metastásica (Maugham, TS. et al. 2103-14).

En la actualidad se está llevando a cabo un ensayo fase III (CALGB 80405) en el cual los pacientes son aleatorizados a FOLFIRI/FOLFOX más cetuximab o bevacizumab o ambos que nos ayudará a dilucidar qué agente biológico es el de elección para la terapia de combinación (Adam, R. et al. 4593-4602).

Metástasis resecables. Se ha demostrado que el empleo de quimioterapia antes de la cirugía, incluso en el caso de metástasis resecables, puede incrementar las tasas de resección completas, facilitar la realización de cirugía conservadora, mejorar el postoperatorio, tratar las micrometástasis, dar información acerca de la respuesta a la quimioterapia y prolongar el periodo libre de enfermedad. El principal estudio que refleja estas conclusiones es el estudio de la EORTC 40983. (Nordlinger, B. et al.1007-1016). En este trabajo se aleatorizaron 364 pacientes con metástasis hepáticas potencialmente resecables a recibir 12 ciclos de FOLFOX4 perioperatorios (6 ciclos previos a la cirugía y 6 ciclos tras la misma) o bien a un tratamiento únicamente quirúrgico. La tasa de resección fue similar en los dos grupos (83.5% versus 83.0%). El objetivo primario del estudio fue la la supervivencia libre de

enfermedad, a los 3 años, la cual se incrementó en un 8.1% (HR=0.77, p=0.041) en aquellos pacientes que recibieron quimioterapia perioperatoria. Gracias a este estudio, la administración de quimioterapia antes y después de la cirugía se considera un estándar en la mayoría de los pacientes con metástasis resecables.

Por otro lado, pequeños estudios no randomizados con XELOX/FOLFOX (Gruenberger, B. et al. 120) o con XELOX más Bevacizumab (Gruenberger, B. et al. 1830-1835) también apoyan el empleo de quimioterapia neoadyuvante en metástasis resecables.

TRATAMIENTO ADYUVANTE. El empleo de quimioterapia tras la resección de las metástasis hepáticas está ampliamente extendido, a pesar de que hay muy pocos estudios randomizados acerca del tratamiento adyuvante, y su empleo se basa en estudios retrospectivos.

La única estrategia que ha demostrado mejorar la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en esta situación es el empleo simultáneo de quimioterapia locorregional mediante infusión de citostáticos en la arteria hepática (HAI, de sus siglas en inglés) y quimioterapia sistémica basada en 5 FU (Kemeny, N. et al. 2039-48). Sin embargo, el empleo de HAI no es una técnica extendida en todos los centros debido a sus requerimientos técnicos especiales y a la necesidad de profesional especializado.

Algunos estudios han analizado el empleo de quimioterapia sistémica tras la resección hepática. El ensayo FFCD-ACHBTH-AURC 9002 randomizó a 173 pacientes a recibir 5FU/LV durante 6 meses o a observación tras la cirugía hepática (Portier,

G. et al. 4976-4982). La supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 años fue del 27% y 34% respectivamente aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Se objetivó no obstante una tendencia hacia una mayor supervivencia global. El ensayo de la EORTC/NCICCTG/GIVIO tenía un diseño similar (Langer, B. et al. 21 (Abstr 592)) y el análisis conjunto de ambos estudios demostró una clara tendencia a un aumento de la SLE y de la SG que, de nuevo, no fueron estadísticamente significativas (Mitry, E. et al. 4906-4911)

Un fase III randomizado que comparaba 5 FU/LV frente a FOLFIRI tras resección R0 de metástasis hepáticas, demostró una SLE de 24.7 meses en los pacientes que habían recibido FOLFIRI frente a 21.6 meses en los pacientes que habían recibido 5 FU/LV, pero de nuevo los resultados no fueron estadísticamente significativos (Ychou, M. et al. 26 (Abstr LBA 4013)) .

A pesar de la ausencia de ensayos clínicos, el análisis de datos de estudios retrospectivos demuestra una mejor supervivencia en los pacientes que reciben tratamiento adyuvante. Por ello, la práctica habitual actual recomienda el empleo de tratamiento adyuvante en los pacientes resecados, fundamentalmente en aquellos que no han recibido tratamiento neoadyuvante

6 FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA

Cuando se produce una alteración en los genes del MMR, se produce una disminución de la respuesta a ciertos fármacos. Se ha demostrado que los pacientes que presentan tumores con MSI tienen una mayor supervivencia que aquellos con estabilidad, y pueden presentar una distinta sensibilidad a la acción de ciertos agentes quimioterápicos, fundamentalmente los antimetabolitos, agentes alquilantes, derivados del platino e inhibidores de las topoisomerasas.

6.1 Factores relacionados con el metabolismo de 5FU

Timidina Fosforilasa (TP). Es la enzima que cataliza la conversión de 5FU a 2'-deoxy-5-fluorouridina (FUDR). La sobreexpresión de TP se ha relacionado tanto con una mayor sensibilidad a 5 FU (Evrard et al. 1726-33) como con un incremento de resistencia a la quimioterapia basada en 5 FU (Metzger et al. 2371-76). Esta disminución de respuesta se basa en el potencial papel de la TP como factor angiogénico y marcador de enfermedad más agresiva.

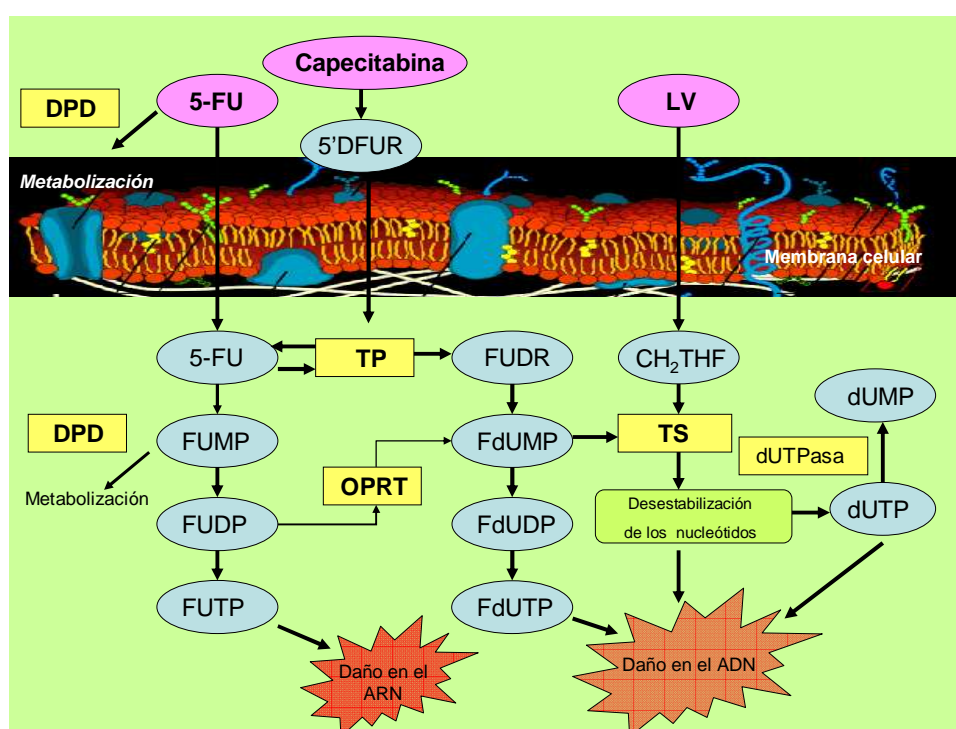
Timidilato Sintasa (TS). FdUMP es el metabolito de 5FU y forma un complejo estable con TS. Como consecuencia de esta unión se produce una inhibición de la actividad de la TS lo que supone una alteración en el balance de nucleótidos y una posterior inhibición de la síntesis y reparación de ADN. La administración conjunta de LV incrementa los niveles intracelulares de este complejo estabilizando el complejo terciario y optimizando la inhibición de la TS.

Una alta expresión de TS se ha relacionado con una mayor resistencia a 5 FU (Johnston et al. 1407-12; Cascinu et al. 239-44) y una peor supervivencia (Popat,

Matakidou, and Houlston 529-36). Otros estudios, por el contrario, lo relacionan con un aumento de eficacia al fármaco (Edler et al. 488-92). A pesar de la discrepancia de estos estudios sus resultados no son comparables entre ellos debido a los diferentes métodos de determinación enzimática (PCR vs inmunohistoquímica).

Dihidropirimidina Deshidrogenasa (DPD). Es la enzima encargada del catabolismo del 5 FU. Variaciones en los niveles de expresión de DPD tienen un efecto directo en la biodisponibilidad del 5FU: niveles más altos aumentan el catabolismo del 5 FU y por lo tanto disminuyen los niveles de este fármaco (Diasio and Harris 215-37). De manera similar, los pacientes con mutaciones que inactivan el gen de la DPD experimentan altas toxicidades secundarias a 5 FU puesto que no puede ser degradado (Lyss et al. 239-40) (Figura: 6).

Figura: 6 Metabolismo del 5 FU



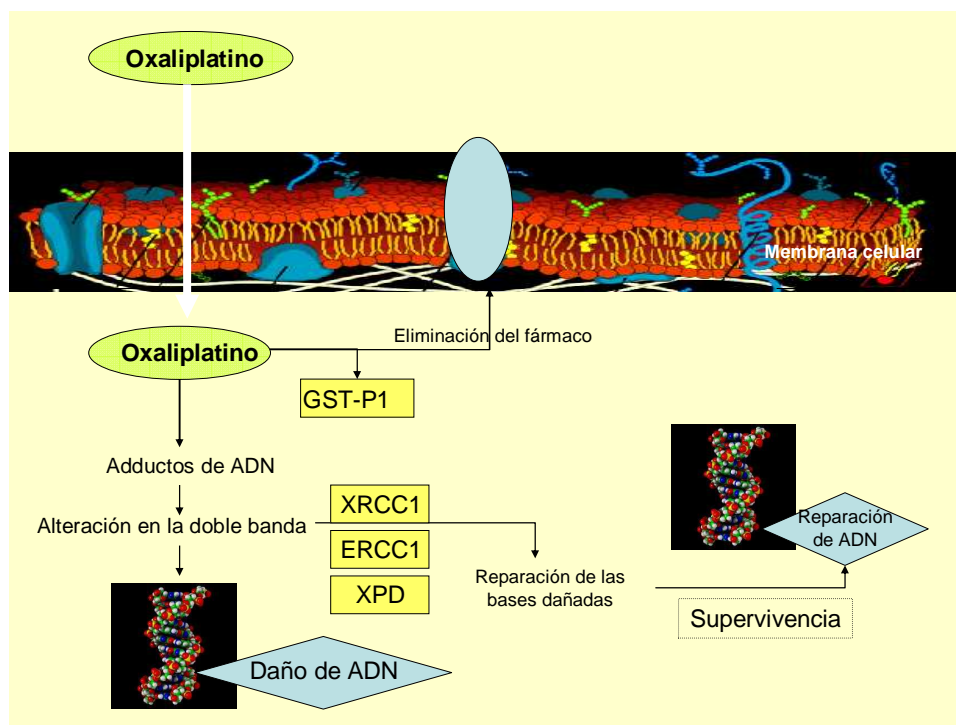
6.2 Factores relacionados con el metabolismo del Oxaliplatino

El oxaliplatino induce daño en el ADN formando adductos que bloquean su replicación y transcripción e inician la apoptosis celular (Adjei 265-77). Cuando daña el ADN, las células intentan repararlo, gracias a la vía NER (Nucleotide Excision Repair, en inglés) (Reardon et al. 3968-71) La proteína **ERCC1** (Excision Repair Cross Complementing, en inglés) es un miembro de la vía NER. ERCC1 forma un complejo con el Xeroderma pigmentosum group F (XPF) que reconoce y rompe la cadena de ADN dañada por el oxaliplatino e intenta repararla. Los pacientes con niveles de ERCC1 elevados responden peor a terapias basadas en platino (Metzger et al. 309-16) (Figura: 7).

Otro gen que codifica una importante proteína en la vía NER es el Xeroderma Pigmentosum group D (XPD). Variantes polimórficas de esta proteína se han relacionado con una menor respuesta al tratamiento basado en 5 FU/Oxaliplatino (Park et al. 8654-58).

Otra importante familia de enzimas en el metabolismo del oxaliplatino es la **Glutation-S-Transferasa (GST)**, que juega un papel fundamental en la detoxificación del oxaliplatino. Polimorfismos en esta enzima se correlacionan con alteraciones en la respuesta a terapias basadas en platinos (Stoehlmacher et al. 936-42).

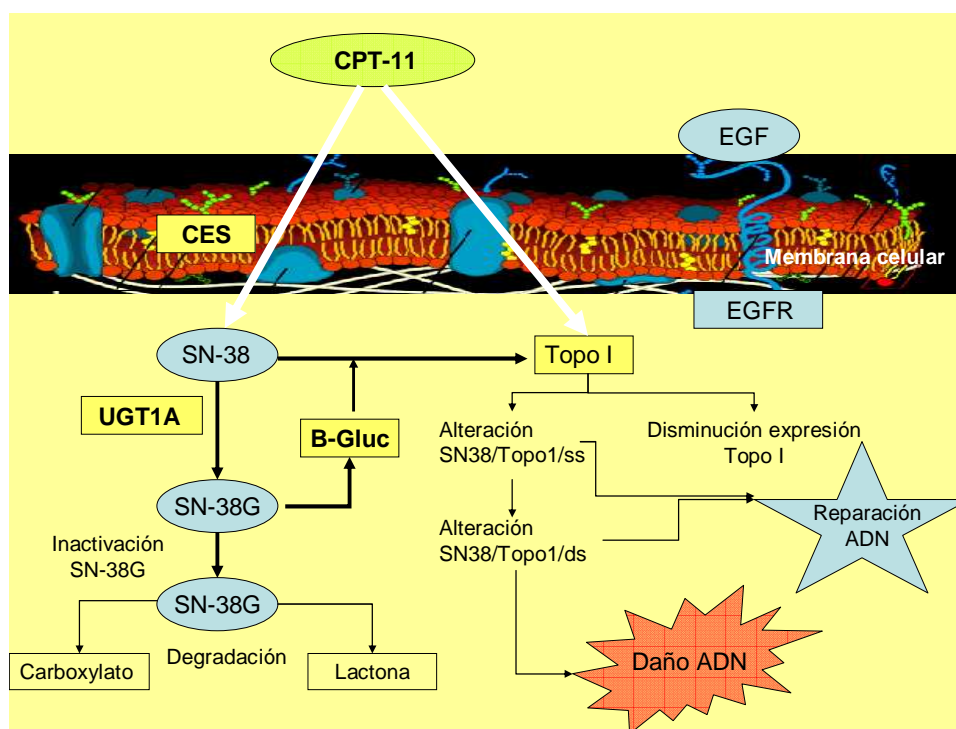
Figura: 7 Mecanismo de acción del Oxaliplatino



6.3 Factores relacionados con el metabolismo del CPT-11

El irinotecán (CPT-11) es un análogo de la camptotecina cuya diana es la topoisomerasa I (topo I), que origina inhibición de la replicación del ADN y la posterior muerte celular (Figura: 8). La expresión de Topo I se ha investigado como marcador de respuesta. En animales se ha demostrado que los niveles de esta enzima predicen la respuesta al irinotecán (Lansiaux et al. 471-76), pero estos resultados no se han podido corroborar en pacientes (Paradiso et al. 252-58).

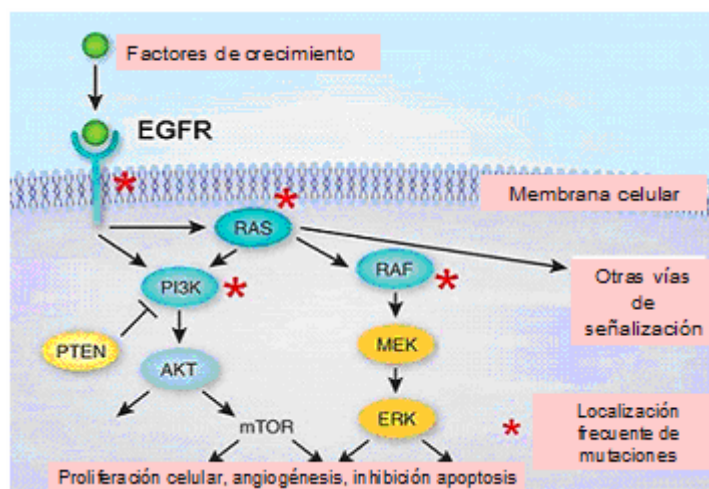
Figura: 8 Mecanismo de acción del Irinotecán



6.4 Factores relacionados con los fármacos anti-EGFR.

La activación del EGFR desencadena dos vías de señalización intracelular, RAS-MAPK y PIK3CA. Esta activación juega un papel importante en la tumorigénesis gracias a la fosforilación de varias proteínas y factores de transcripción que controlan el crecimiento celular, la diferenciación y apoptosis (Scaltriti and Baselga 5268-72). Entre estas proteínas, KRAS, BRAF, PIK3CA y PTEN adquieren especial relevancia en el CCR. Mutaciones en KRAS, BRAF y PIK3CA producen una activación ininterrumpida de las vías de señalización intracelular promoviendo el crecimiento tumoral (Figura: 9)

Figura: 9 Cascada de señalización de EGFR



El papel pronóstico de las mutaciones de KRAS (más frecuentes en codones 12 y 13) no ha quedado bien esclarecido en los diferentes estudios, a pesar de que algunos las relacionan con un mayor riesgo de recaída (Russo et al. iv44-iv49). Por el contrario, su papel como marcador predictivo está firmemente establecido. Lieve y colaboradores demostraron una ausencia de respuesta a terapia basada en EGFR entre los tumores con KRAS mutado (Lieve et al. 3992-95; Amado et al. 1626-34). Resultados de los estudios CRYSTAL y OPUS mostraron que los pacientes con mutaciones en KRAS no se benefician de la terapia basada en anti-EGFR (Bokemeyer et al. 663-71; Van Cutsem et al. 1408-17). No obstante, se ha confirmado que no todas las mutaciones de KRAS presentan la misma sensibilidad a los tratamientos con anti-EGFR. Así, las mutaciones en el exón 13 presentan una mayor SG y SLP en los pacientes tratados con Cetuximab que los pacientes con otras mutaciones (de Roock, W. et al. 1812-1820). Una comunicación oral en el reciente Congreso Americano (ASCO 2011) planteó incluso la hipótesis de que los

los pacientes con mutaciones KRAS G13D podrían beneficiarse de un tratamiento con Cetuximab en primera línea (Tejpar, S. et al. Abstr 3511)

BRAF es la siguiente molécula en la vía de señalización de EGFR. Las mutaciones de KRAS y BRAF son mutuamente excluyentes. Se ha demostrado que los tumores con mutaciones BRAF V600E no se benefician del tratamiento con cetuximab ni con panitumumab y presentan un menor intervalo libre de enfermedad y una menor SG que los pacientes con BRAF wild-type (Di Nicolantonio et al. 5705-12).

Las mutaciones de PIK3CA y la pérdida de la expresión de PTEN confieren resistencia al tratamiento con Cetuximab en estudios realizados in vitro (Jhawer et al. 1953-61). In vivo, las mutaciones de PIK3CA y la pérdida de PTEN se asocia con una falta de respuesta a cetuximab y a panitumumab (Sartore-Bianchi et al. 1851-57). Además, se relacionan con una peor SG.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

7 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el momento actual cada vez se dispone de un mayor número de terapias dirigidas en las que es preciso conocer la expresión de ciertos genes en el tumor para identificar el grupo de pacientes que pueden obtener beneficio con su empleo. Puesto que a menudo no es posible biopsiar tejido tumoral de las metástasis, se asume que el perfil de expresión génica de las metástasis refleja fielmente lo que ocurre en el tumor primario. Sin embargo, es sabido que el genotipo de la célula tumoral es inestable y que a lo largo del proceso de la metastatización pueden surgir cambios en la expresión de determinados genes que pueden modificar la sensibilidad a los tratamientos.

El CCR con metástasis hepáticas es un escenario idóneo para comprobar si esto es así, ya que hasta en el 20-35% de los casos las metástasis son resecables, siendo posible disponer de tejido tanto del tumor primario como de las metástasis.

7.1 Hipótesis de trabajo.

Tras realizar un estudio retrospectivo de numerosas variables clínicas en más de un centenar de pacientes diagnosticados de cáncer de colon con metástasis hepáticas resecadas, nos planteábamos la hipótesis de que la expresión génica de ciertos factores moleculares podría diferir en el tumor primario y en la metástasis.

Las hipótesis estadísticas se definieron de la siguiente manera:

- Hipótesis nula: la expresión de algunos marcadores moleculares detectados mediante qRT-PCR en el tumor primario y en su metástasis a distancia no presenta diferencias significativas.

- Hipótesis alternativa: la expresión de algunos marcadores moleculares detectados mediante qRT-PCR en el tumor primario y en su metástasis a distancia presentan diferencias significativas.

7.2 Objetivos.

7.2.1 Objetivo principal.

- Estudiar y comparar el perfil de expresión de genes involucrados en la sensibilidad/resistencia al tratamiento antineoplásico en tumores primarios colorrectales y sus metástasis hepáticas para comprobar si puede asumirse la hipótesis de que la expresión génica del primario es completamente extrapolable a la de las metástasis.

7.2.2 Objetivos secundarios.

- Relacionar los cambios dinámicos encontrados en la expresión génica con la evolución clínica en función de variables clínicas y patológicas.
- Comparar el índice de concordancia de las moléculas de la vía EGFR entre los primarios y las metástasis debido a su relevancia clínica y potencial terapéutico.
- Evaluar la utilidad de los sistemas pronósticos clínico-patológicos actuales tras la resección de metástasis hepáticas.
- Identificar los factores pronósticos de SG y SLE en nuestra serie.

Con este estudio pretendemos validar la estrategia terapéutica actual que busca individualizar el tratamiento utilizando fármacos dirigidos a la expresión de

determinados genes en el tumor primario, asumiendo que la metástasis también lo expresa. Los resultados que se obtengan con este estudio, tanto en uno como en otro sentido, tendrán una clara aplicación clínica, ya que si se confirma la hipótesis nula avalarían la estrategia actual, pero si se obtuviera la hipótesis alternativa, se debería recomendar la biopsia de la metástasis hepática para identificar a los pacientes que potencialmente se beneficiarían del tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODO

8 MATERIAL Y MÉTODO

8.1 Características clínico-patológicas

Antes de iniciar la recogida de datos clínicos el proyecto fue presentado para su evaluación al Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz. Una vez emitido un informe favorable, se procedió, por un lado, a recoger de manera retrospectiva el historial clínico de 121 pacientes diagnosticados de adenocarcinomas de recto y colon que habían desarrollado metástasis hepáticas durante el curso de su enfermedad y fueron sometidas a resección quirúrgica. Simultáneamente, se recogieron las muestras anatomopatológicas conservadas en parafina de los tumores primarios y las metástasis resecadas, donde se identificaron diecinueve genes para determinar las modificaciones de su expresión en el tumor primario y en la metástasis hepática así como su valor pronóstico tras la hepatectomía. Posteriormente, en las muestras de 100 pacientes se realizó una determinación de las moléculas relacionadas con la vía de señalización del EGFR: KRAS, BRAF y PI3KCA (mediante PCR) y los marcadores EGFR, PTEN y pAKT (mediante inmunohistoquímica). Los pacientes pertenecían al Hospital Universitario La Paz.

8.1.1 Criterios de inclusión

Se establecieron los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma de origen colorrectal.

- Estadios IV de la AJCC (al diagnóstico o o en el transcurso de la enfermedad), con enfermedad hepática resecada con intención curativa.
- Resección quirúrgica de la tumoración primaria y de la metástasis hepática. Los pacientes en los que se obtuvo únicamente una biopsia hepática fueron excluidos.
- Disponibilidad de muestra tumoral conservada en parafina tanto del tumor primario como de las metástasis hepáticas.

De todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión se consiguieron muestras tumorales en 107 de ellos, sobre los que posteriormente se realizó la extracción del ARN.

8.1.2 *Datos clínicos y anatomopatológicos*

Los datos clínicos y anatomopatológicos que se recogieron de manera retrospectiva fueron los siguientes:

- Número de Historia Clínica.
- Edad al diagnóstico.
- Sexo.
- Tipo de tumoración primaria (colon versus recto)
- Estadio primario de la tumoración.
- Grado de diferenciación del tumor primario.
- Nivel de CEA preoperatorio.
- Presencia de obstrucción/perforación al diagnóstico.

- Presencia de invasión linfática, venosa y perineural en la tumoración primaria.
- Tipo de tratamiento adyuvante recibido y número de meses de terapia.
- Intervalo libre de enfermedad entre la tumoración primaria y el desarrollo de metástasis hepáticas.
- ECOG en el momento de la resección hepática.
- Datos analíticos en el momento de la resección hepática: (Fosfatasa alcalina, GammaGlutamylTransferasa, CEA, Ca 19.9, Linfocitos, Monocitos, Neutrófilos).
- Tiempo de aparición de las metástasis hepáticas (síncronas o metácronas con respecto al tumor primario).
- Número de metástasis, localización (uni o bilobular), tamaño total de las metástasis.
- Extensión de la afectación hepática.
- Presencia o no de tratamiento quimioterápico neo-adyuvante y tipo de terapia (Oxaliplatino, Fluorouracilo, Cetuximab, Avastín, Capecitabina, UFT...).
- Número de ciclos recibidos y tiempo antes de la cirugía.
- Tipo de respuesta de la enfermedad a los 2-3 meses de tratamiento neoadyuvante (Respuesta Completa, Respuesta Parcial, Enfermedad Estable, Enfermedad Progresiva) según criterios RECIST.
- Estudio histopatológico de la metástasis hepática: invasión de grandes vasos, invasión de vía biliar, invasión linfática intrahepática, afectación de márgenes quirúrgicos.

- Estudio histopatológico del hígado sano adyacente: presencia de esteatosis, esteatohepatitis, dilatación sinusoidal, extravasación de eritrocitos.
- Procedimiento quirúrgico empleado (nodulectomía, segmentectomía, hepatectomía).
- Realización de Ecografía Intraoperatoria durante la cirugía.
- Mortalidad y morbilidad tras la cirugía.
- Tipo de tratamiento quimioterápico adyuvante recibido (oxaliplatino, fluorouracilo, cetuximab, avastín, capecitabina, UFT).
- Supervivencia Libre de Enfermedad desde la cirugía.
- Tipo de recaída (local o a distancia).
- Supervivencia Global tras la cirugía hepática.

8.2 Selección de genes

La selección de genes se realizó tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica. Se seleccionaron fundamentalmente dos tipos de genes: por un lado, genes con un papel importante en la carcinogénesis, invasión y metastatización de los tumores de origen colorrectal. Por otro lado, se seleccionaron genes relacionados con la resistencia a los principales fármacos empleados para el tratamiento del CCRm (5 FU, Oxaliplatino, Irinotecán) (Tabla: 2). Se incluyeron además 3 genes housekeeping (GAPDH, B2M y PSMB4) para normalizar los resultados. Estos genes

son constitutivos y su expresión no está modulada, por lo que los cambios en los mismos son un fiel reflejo de los cambios en la cantidad de cDNA.

Tabla: 2 Parejas de genes determinados mediante PCR

GENES	UNIGENE	ASSAY	DESCRIPCIÓN
CXCR4	HS.593413	Hs00237052_m1	Receptor de citoquinas implicado en la señalización tumoral.
CCR 6	HS.46468	Hs00171121_m1	Receptor de citoquinas implicado en la señalización tumoral.
TSP 1	HS.164226	Hs00962908_m1	Inhibidor angiogénico.
VEGF A	HS.73793	Hs00900054_m1	Proteína proangiogénica.
e -cadherina	HS.461086	Hs00170423_m1	Molécula de adhesión.
MMP-9	HS.297413	Hs00234579_m1	Metaloproteinasa (enzimas proteolíticas de la matriz extracelular).
UROKINASA A (PLAU)	HS.77274	Hs00170182_m1	Proteasa del sistema de activación del plasminógeno.
h TERT	HS.492203	Hs00162669_m1	Transcriptasa de la Telomerasa humana.
TS	HS.592338	Hs00426591_m1	Timidilato sintasa: enzima encargada de la síntesis de fluoropirimidinas.
TP	HS.592212	Hs00157317_m1	Timidina Fosforilasa: encargada de la síntesis de las pirimidinas.
DPD	HS.335034	Hs00559279_m1	DihidropirimidinaDeshidrogenasa, encargada del catabolismo de las purinas.
ERCC 1	HS.435981	Hs00157415_m1	Proteína de la vía de excisión de nucleótidos.
GST-PI	HS.523836	Hs00168310_m1	Glutation S Transferasa I: enzimas detoxificación hepática
TOPOISOMERASA 1	HS.592136	Hs00243257_m1	Mantiene la configuración helicoidal del ADN
K-RAS	HS.505033	Hs00364282_m1	Proteína de la cascada de señalización EGFR

FAS/CD95	HS.244139	Hs00163653_m1	Gen promotor de la apoptosis
BAX	HS.631546	Hs00414514_m1	Gen promotor de la apoptosis
SMAD4	HS.75862	Hs00232068_m1	Gen supresor de tumores

Debido a la importancia de las terapias anti-EGFR en el tratamiento del cáncer colorrectal se decidió estudiar también el grado de concordancia de las moléculas implicadas en la cascada de señalización de EGFR: KRAS, BRAF, PI3KCA, PTEN y pAKT. Para ello, se realizó un estudio mutacional de KRAS, BRAF y PI3KCA y se determinó mediante inmunohistoquímica el grado de expresión de EGFR, PTEN y pAKT.

8.3 Selección de sistemas pronósticos tras la resección de metástasis hepáticas.

Para evaluar los sistemas pronósticos publicados se realizó una búsqueda bibliográfica de todos los sistemas desarrollados para intentar predecir el pronóstico tras la resección de metástasis hepáticas. Posteriormente, se intentó validarlos estadísticamente en los pacientes recogidos en nuestra muestra. De los ocho sistemas identificados en la literatura pudimos aplicar seis de ellos en nuestra serie. No se pudo emplear el modelo de Robertson por no tener recogida en nuestra base la presencia de comorbilidades, ni el de Schindl por no disponer de los niveles de Albúmina (Tabla: 3). Puesto que sólo disponíamos de todas las variables que requiere el sistema pronóstico de Lise en 43 pacientes, decidimos no incluirlo en los resultados.

Tabla: 3 Sistemas de estadificación pronóstica tras la resección de metástasis hepáticas

Estudio (año)	n	Variables pronósticas
*Robertson y cols (2009)	3957	Edad avanzada Comorbilidades Resección síncrona primario-metástasis
*Aldrighetti y cols (2005)	297	Primarios G1 vs G3 Nivel CEA prequirúrgico > 5 y >200 Diámetro mayor de las lesiones >5 cm Intervalo libre de enfermedad > 12 meses Buen Performance Status
*Fong y cols (1991)	1001	Afectación márgenes quirúrgicos Afectación extrahepática Invasión ganglionar Intervalo libres de enfermedad >12 meses Número de metástasis >1 Tamaño de las metástasis >5cm Nivel CEA prequirúrgico > 200
*Schindl y cols (2005)	131	Estadio del tumor primario Número de metástasis hepáticas Niveles de CEA Niveles de albúmina Niveles de Fosfatasa Alcalina
*Lise y cols (2001)	135	Porcentaje de invasión hepática Afectación ganglionar del tumor primario Número de metástasis hepáticas Niveles prequirúrgicos de transaminasas Tipo de resección hepática
*Nordlinger y cols (1996)	1568	Edad >60 años Afectación serosa tumor primario Afectación ganglios linfáticos regionales Intervalo libre de enfermedad < 24 meses Margen resección metástasis < 1cm Tamaño metástasis > 5cm Niveles CEA

*Iwatsuky y cols (1999)	305	> 3 metástasis hepáticas Tamaño de las metástasis > 8 cm Intervalo libre de enfermedad < 30 meses Metástasis hepáticas bilobares
*Ueno y cols (2000)	85	Agresividad del tumor primario (grado de diferenciación) Aparición temprana de metástasis hepáticas (sincronicidad) Número de metástasis hepáticas.

8.4 Procesamiento de las muestras

Inicialmente se seleccionaron las muestras de las piezas quirúrgicas tanto del tumor primario como de las metástasis hepáticas. En el caso de pacientes con varias intervenciones quirúrgicas se obtuvieron muestras de las distintas intervenciones quirúrgicas. Entre ellas, se eligieron las muestras que tenían al menos un 80% de células tumorales. Para ello, se realizó una macro-disección de las piezas utilizando una cuchilla estéril y se preparó un bloque nuevo con el tejido seleccionado. Posteriormente, se siguieron los siguientes pasos:

- aislamiento del ARN total
- síntesis del ADN complementario
- análisis y medida de la expresión génica mediante PCR cuantitativa.

8.4.1 Aislamiento del ARN total.

Para la extracción del ARN se realizaron de 10 a 15 secciones de tejido parafinado de 7 µm de grosor. Posteriormente se realizó un proceso de desparafinación y rehidratación del tejido mediante tratamiento con xilol y lavado con alcoholes de grado decreciente comenzando con alcohol al 100% y finalizando con alcohol al 70%. Posteriormente se digirió el tejido mediante un tratamiento con proteinasa K y DNasa I para eliminar el ADN. El ARN se precipitó con isopropanol, utilizando para este proceso los reactivos del kit MASTERPURE RNA PURIFICATION (EPICENTRE). La concentración y pureza del ARN total se determinó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Así mismo, se evaluó la calidad de los distintos ARN mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

8.4.2 Síntesis del ADN complementario

Una vez finalizada la reacción de amplificación es necesario sintetizar el ADNc correspondiente al ARN total aislado. Para conseguirlo, se empleó el kit HIGH-CAPACITY Cdna ARCHIVE (Applied Biosystems) en un volumen de 50 µl. Se decidió abordar la síntesis de ADNc a partir de 200 ng de ARN total de cada una de las muestras. Posteriormente se realizó una reacción de transcripción reversa siguiendo el protocolo del kit comercial empleándose hexámeros al azar como cebadores. El programa que se siguió constaba de dos fases:

- primera parte: se mantenían 10 minutos a una temperatura de 25°C
- segunda parte: se mantenía a 120 minutos a una temperatura de 37°C

8.4.3 Reacción de PCR cuantitativa

Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en un termociclador tipo ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) perteneciente al Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid. Las amplificaciones se realizaron por duplicado, con los ensayos específicos prediseñados para cada gen, y como soporte se utilizaron las tarjetas microfluídicas (Taqman Low Density Arrays) diseñadas por Applied Biosystems. Cada uno de los puertos de la tarjeta contenía 50 μ L de Taqman Universal PCR Master Mix y 50 μ L del ADNc correspondiente (cantidad equivalente a 100 ng del ARN total, que fue la misma para todas las muestras). La expresión de cada gen definida por el valor “Ct” (ciclo de amplificación requerido para alcanzar un umbral mínimo establecido) se midió por duplicado y se normalizó relativo a la media de tres genes *housekeeping* (GAPDH, B2M y PMSB4).

8.4.4 Análisis mutacional

Para amplificar los 139 pares de bases del exon 2 de KRAS se empleó una PCR usando cebadores específicos. También se utilizaron cebadores específicos para amplificar el exon 15 del gen BRAF y los exones 9 y 20 de PI3KCA, conforme a estudios previos en la literatura (Moroni M et al, 279-86) (Tabla: 4). La eficacia y calidad de la amplificación de la PCR se confirmaron en un gel de agarosa al 2%. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción sin añadir ADN. En las reacciones se utilizaron los cebadores a una concentración final de 0,5 μ M, una concentración de deoxinucleótidos de 0,8mM y una concentración de DNA de 100

nM. Se utilizó Taq polimerasa de la casa comercial Applied Biosystems. Las reacciones de amplificación tuvieron 35 ciclos y la temperatura de anillamiento fue de 56°C, 57°C, 55°C y 55°C para la amplificación de KRAS, PI3KCA exon 9, PI3KCA exon 20 y BRAF respectivamente. Los productos amplificados fueron purificados mediante el kit de purificación QuickStep™ 2 96-well PCR Purification Kit (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) según las indicaciones del fabricante. Se realizaron los análisis de secuencia del ADN con un secuenciador multi-capilar de ADN y con el método de fluorescencia, en el Parque Científico de Madrid.

Tabla: 4 Parejas de oligonucleótidos empleados en las amplificaciones

KRAS	Forward	5-TTATAAGGCCTGCTGAAAATG-3
	Reverse	5-CAAGATTTACCTCTATTGTTGGATCA-3
BRAF (exon 15)	Forward	5-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3
	Reverse	5-AGCATCTCAGGGCCAAAAT-3
PIK3CA (exon 9)	Forward	5-GGGAAAAATATGACAAAGAAAGC-3
	Reverse	5-CTGAGATCAGCCAAATTCAGTT-3
PIK3CA (exon 20)	Forward	5-CTCAATGATGCTTGGCTCTG-3
	Reverse	5-TGGAATCCAGAGTGAGCTTTC-3

8.4.5 Análisis inmunohistoquímico.

Se determinó la inmunoreactividad de EGFR, PTEN y pAKT mediante inmunohistoquímica en tissue-arrays. Se incluyeron los tumores primarios y las metástasis de pacientes con KRAS wild type en 10 tissue arrays que contenían de 20 a 40 casos por duplicado. Se obtuvieron secciones de 4µm de los bloques de tissue-

arrays fijados en parafina. Posteriormente se desparafinaron y se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena mediante incubación de H₂O₂ al 3% en metanol durante 10 minutos. Los antígenos se obtuvieron mediante incubación en EDTA durante 15 minutos a 155°C. La detección de EGFR mediante IHQ se realizó con el pharmDx kit (Dako, Carpintería) según protocolo. Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a pAKT (AKT1-phospho T308; ab38449-Abcam, Cambridge, UK) y frente a PTEN (MMAC1 Ab-4, Clone 17A-Thermo Scientific, Fremont, CA) se diluyeron en BSA al 1% (1:50) y en TBS al 1% (1:250). Las muestras de tejido se incubaron con el anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron en TBS y se incubaron con el kit basado en peroxidasa EnVision™ (Dako Corporation Carpintería CA, USA) durante 30 minutos. Posteriormente las muestras se incubaron con sustrato cromogénico de diaminobenzidina durante 5 minutos. Finalmente las muestras se tiñeron con hematoxilina y se deshidrataron con alcoholes graduados aclarándose con xileno. La tinción inmunohistoquímica de EGFR se consideraba positiva cuando al menos un 1% de las células malignas mostraba la tinción en la membrana celular (Loupakis et al, 2622-9). La tinción de PTEN y pAKT se llevó a cabo según la técnica descrita por Loupakis y colaboradores (Loupakis et al, 2622-9) en función de la intensidad de la inmunoreactividad y el porcentaje de las células.

8.5 Análisis estadístico

8.5.1 *Estadística descriptiva.*

Para resumir los datos de las diferentes variables se calcularon los estadísticos correspondientes en función del tipo de variable. Para realizar la descripción de los datos cualitativos se emplearon las frecuencias absolutas y los porcentajes, mientras que para los datos cuantitativos se han empleado los estadísticos habituales (media, mediana, desviación típica y rango, este último expresado como mínimo y máximo). Se han realizado también gráficos de cajas donde aparecen representados los cuartiles, rango intercuartílico y los valores anómalos. La distribución del tiempo de seguimiento (SG) y la supervivencia libre de recaída (SLE) se ha representado utilizando el método de Kaplan-Meier.

8.5.2 *Comparación de perfiles de expresión.*

En la comparación de los niveles de expresión génica entre tumor primario y metástasis, se ha usado el test de la **t-Student** para datos pareados. La magnitud del cambio entre ambos tumores se ha estimado mediante la media de las diferencias observadas así como su intervalo de confianza del 95%. La correlación entre ambas medidas se ha estudiado mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

8.5.3 *Normalización de Ct*

Como paso previo al análisis de los datos procedentes de la PCR-QT se procedió a la normalización de los mismos. Para ello se ha utilizado la media de tres genes en la serie completa de pacientes. Estos tres genes se eligieron tras el estudio de su

estabilidad en muestras de cáncer colorrectal utilizando el programa informático GENORM (Vandesompele, J. et al. 0034). Los tres genes empleados fueron GAPDH, B2M y PMSB4.

8.5.4 Análisis del valor pronóstico de las variables y evaluación de los sistemas pronósticos previos.

El estudio de los factores pronósticos tras la resección de metástasis hepática para SLE y SG, se ha realizado en el marco estadístico conocido como Análisis de Supervivencia. Para calcular el tiempo hasta la recaída como para el tiempo hasta el éxito se ha estimado la asociación y valor pronóstico tanto de variables clínicas como de expresión génica mediante modelos de regresión de Cox univariante. El valor de las variables de expresión génica ajustado por factores clínicos, se ha analizado mediante un modelo de regresión de Cox multivariante. Como norma general, se han considerado significativos los valores p menores de 0.05. Para realizar la validación de los sistemas pronósticos descritos en la literatura se ha estudiado el comportamiento de las distintas variables en cada uno de los sistemas de manera independiente frente a SLE y frente a Supervivencia Global con el análisis estadístico de Kaplan Meier y el test de tendencia lineal. Posteriormente se ha realizado análisis uni y multivariantes mediante regresión de Cox para establecer el riesgo de muerte de los pacientes en función de las distintas variables.

8.5.5 Análisis de la correlación mutacional.

Para determinar la asociación entre las alteraciones moleculares y las características clinicopatológicas se utilizó el test exacto de Fisher. La concordancia entre las tumoraciones primarias y sus correspondientes metástasis se analizó empleando el índice de kappa, y la discordancia mediante el test de simetría de McNemar. Una concordancia moderada se definía con coeficientes de $0.41 \leq k \leq 0.60$ y una concordancia buena con coeficientes de $0.61 \leq k \leq 0.80$, respectivamente (Landis et al, 363-74). Se aplicó el concepto de bilateral (dos colas) con un nivel de significación del 5% y una potencia del 80%.

El análisis estadístico se ha realizado mediante el programa SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.).

RESULTADOS

9 RESULTADOS

9.1 Características clínico-patológicas del total de la muestra

Las características clínico-patológicas de los 121 pacientes incluidos en el estudio se describen en la Tabla: 5. Las características propias de la intervención hepática se reflejan en la Tabla: 6. La mediana de edad fue de 64 años (rango 29-86). La proporción hombre-mujer fue 83/38. En 89 pacientes, la localización del tumor fue en colon y en 32 en recto. 70 pacientes (57.9%) fueron estratificados como estadios IV al diagnóstico (desarrollaron las metástasis hepáticas de forma sincrónica al tumor primario) 102 pacientes (86.4%) recibieron tratamiento adyuvante basado en 5 FU tras la resección del tumor primario. De ellos, 26 pacientes (22%) recibieron además oxaliplatino. 34 pacientes (28.8%) recibieron tratamiento quimioterápico previo a la cirugía hepática (tratamiento “neoadyuvante” o terapia de conversión) y 89 pacientes (84.4%) recibieron tratamiento tras la cirugía hepática (tratamiento “adyuvante”). Veintiocho pacientes (23%) recibieron tratamiento pre y postquirúrgico. Trece pacientes (11.2%) fallecieron como consecuencia directa del acto quirúrgico. Cuarenta y un pacientes presentaron un nivel de CEA superior a 5 previo a la hepatectomía. Las medianas de fosfatasa alcalina y de GGT previas a la cirugía hepática fueron de 156 (rango 3-786) y de 38 (rango 4-547) respectivamente.

El análisis de expresión génica se pudo realizar en 53 tumores primarios y en 42 metástasis hepáticas. Entre ellos, en 32 pacientes se pudo determinar la cuantificación génica en el primario y en su correspondiente metástasis hepática.

La mediana de seguimiento tras la hepatectomía fue de 36 meses (95% IC, 25-47) y la mediana de supervivencia fue de 18 meses (95% IC, 13-23) (Figura: 10;Figura: 11).

Tabla: 5 Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos.

Variable	Número de pacientes (porcentaje)
Edad	Mediana: 64 (Rango 29-86)
Sexo	
Hombre	83 (68.3%)
Mujer	38 (31.7%)
Primario	
Colon	89 (73.6%)
Recto	32 (26.4%)
Estadio	
I	2 (1.7%)
II	21 (17.4%)
III	28 (23.1%)
IV	70 (57.9%)
Grado de diferenciación	
Bien diferenciado	3 (2.5%)
Moderadamente diferenciado	109 (90.1%)
Indiferenciado	9 (7.4%)
Debut como obstrucción	21 (17.4%)
Debut como perforación	4 (3.3%)
Presencia infiltración venosa	25 (20.7%)
Presencia infiltración perineural	15 (12.4%)
Administración de tratamiento adyuvante	
No	17 (14.1%)
5FU/LV	77 (63.6%)
FOLFOX	27 (22.3%)
ECOG	

0	85 (70.2%)
1	34 (28.1%)
2	2 (0.8%)
Extensión de las metástasis	
<25% parénquima hepático	99 (81.8%)
25-50% parénquima hepático	20 (16.5%)
>50% parénquima hepático	2 (1.7%)
Invasión grandes vasos	7 (5.8%)
Invasión vía biliar	4 (3.3%)

Tabla: 6 Datos relacionados con el manejo de las metástasis hepáticas

Variable	Número de pacientes (porcentaje)
Administración de neoadyuvancia	34 (28.8%)
Histología hepática	
Afectación márgenes quirúrgicos	52 (43%)
Esteatosis	31 (25.6%)
Hepatitis	4 (3.3%)
Fibrosis	2 (1.7%)
Tipo de cirugía hepática	
Metastasectomía	41 (33.9%)
Segmentectomía	33 (27.3%)
Hepatectomía	33 (27.3%)
Desconocida	14 (11.6%)
Mortalidad quirúrgica	13 (11.2%)
Morbilidad quirúrgica	30 (25.9%)
Administración de adyuvancia postcirugía	89 (84.8%)

Figura: 10 Meses de seguimiento tras la cirugía hepática

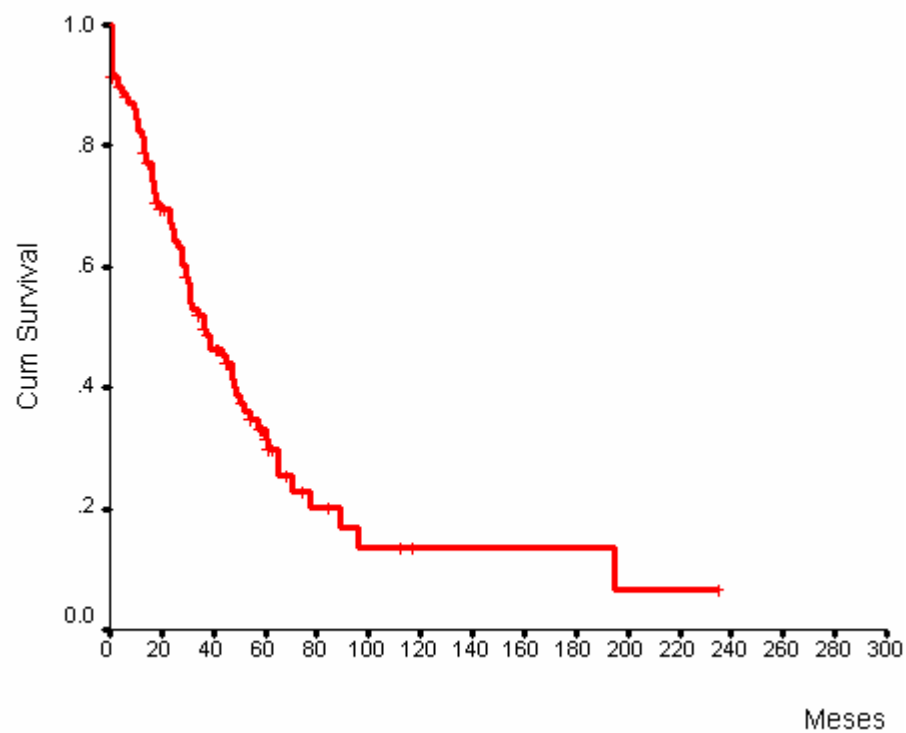
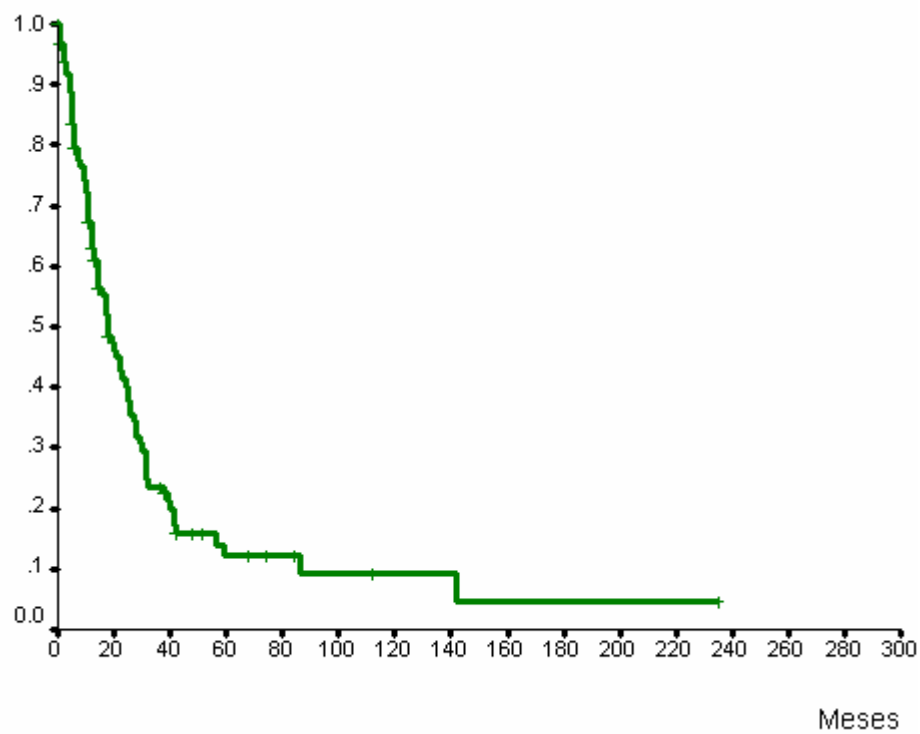


Figura: 11 Meses de supervivencia tras la cirugía hepática



9.2 Características clínico-patológicas y diferencias de expresión génica de los pacientes con identificación de genes en el tumor primario y en la metástasis hepática.

En 32 pacientes obtuvimos la identificación de genes tanto en el tumor primario como en su metástasis a distancia. Las características clínico-patológicas se pueden ver en la Tabla: 7. La mediana de edad de estos pacientes fue de 63 años (rango 29-83). 22 pacientes (68.8%) eran varones frente a 10 pacientes (31.3%) mujeres. En 21 pacientes (65.6%) la localización del primario era en el colon y en 11 pacientes (34.4%) en el recto. 20 pacientes (62.5%) presentaron las metástasis hepáticas de forma síncrona a la tumoración primaria. 17 pacientes (53.1%) recibieron tratamiento adyuvante basado en 5-Fluorouracilo. 7 pacientes (21.9%) recibieron además tratamiento con oxaliplatino. 12 pacientes (38.7%) recibieron quimioterapia previa a la cirugía hepática y 20 pacientes (76.9%) recibieron quimioterapia adyuvante tras la resección.

De los 32 pacientes en los que se pudo realizar la determinación de genes en ambas muestras 22 pacientes habían sido intervenidos entre el 2000 y el 2006 y tan sólo 10 pacientes habían sido intervenidos con anterioridad al 2000.

Tabla: 7 Características clínico-patológicas de los pacientes con identificación génica en el primario y en la metástasis (n=32)

Variable	Número de pacientes (porcentaje)
Edad	Mediana 63 (rango 29-83)
Sexo	
Hombre	22 (68.8%)
Mujer	10 (31.3%)
Primario	

Colon	21 (65.6%)
Recto	11 (34.4%)
Estadio	
I	2 (6.3%)
II	4 (12.5%)
III	6 (18.8%)
IV	20 (62.5%)
Grado de diferenciación	
Bien diferenciado	1 (3.1%)
Moderadamente diferenciado	28 (87.5%)
Indiferenciado	3 (9.4%)
Administración de tratamiento adyuvante	
No	8 (25.0%)
5FU/LV	17 (53.1%)
FOLFOX	7 (21.9%)
Modo de aparición de las metástasis	
Metácronas	12 (37.5%)
Síncronas	20 (62.5%)

Del total de los 19 genes analizados, en 6 genes se demostró una diferencia estadísticamente significativa entre el tumor primario y la metástasis a distancia (CXCR4, THBS-1, GSTP1, ECGF1, DPD y MMP9) (Tabla: 8). En el caso de CXCR4, ECGF1 y DPD la expresión en la tumoración primaria era mayor que en la metástasis, mientras que la THBS1, GSTP1 y MMP9 se sobreexpresaban en mayor cantidad en la metástasis hepática (Tabla: 9) Además, en los dos genes relacionados con la apoptosis celular (BAX y FAS) existía una tendencia hacia la significación estadística objetivándose una mayor expresión en la metástasis. [(BAX_m-BAX_p= .54949, SD 1.599649, IC 95% -0.02724 a 1.12623, p=0.061) y (FAS_m-FAS_p=0.45209, SD 1.421111, IC 95% -0.06028 a 0.96445, p=0.082)] (Figura: 12).

Tabla: 8 Estudio comparativo entre las parejas de genes

(En azul se resaltan las parejas cuya correlación también fue ES. ES: Estadísticamente significativa)

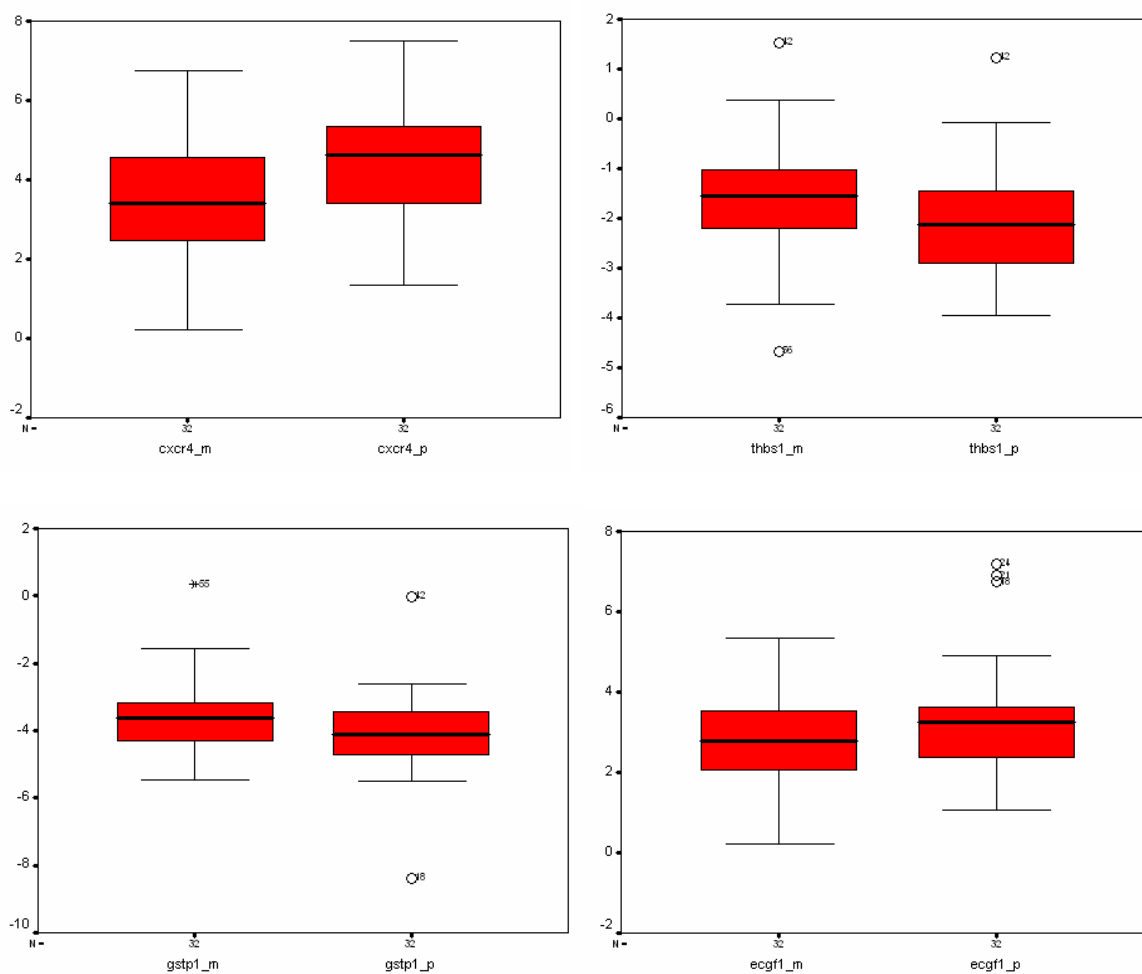
Parejas de genes sin diferencia de expresión génica ES	Parejas de genes con diferencia de expresión génica ES
Topoisomerasa I (p=0.171)	CXCR4 (p=0.001)
SMAD4 (p=0.224)	
hTERT (p=0.578)	Trombospondina (p=0.007)
KRAS (p=0.477)	
BAX (p=0.061)	GSTP-1 (p=0.050)
FAS (p=0.082)	
E-Cadherina (p=0.497)	TP (p=0.042)
ERCC1 (p=0.121)	
VEGF-A (p=0.152)	DPD (p=0.001)
Urokinasa (p=0.259)	
TS (p=0.490)	MMP9 (p=0.048)
CCR6 (p=0.301)	

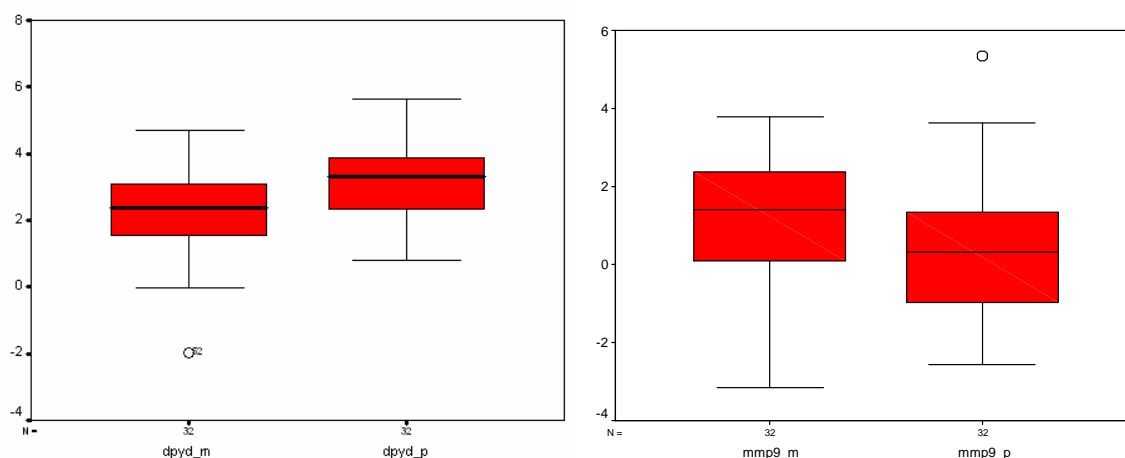
Tabla: 9 Diferencia de expresión génica entre la metástasis y la tumoración primaria

Diferencia de genes	Media	Desviación Estándar	Error Estándar de la media	IC 95% Menor/mayor	P
CXCR4m-CXCR4p	-1.02793	1.650116	.291702	-1.62286/-.43300	0.001
THBS1m-THBS1p	.57568	1.120733	.198119	.17162/.97975	0.007
GSTP1m - GSTP1p	.55324	1.536660	.271646	-.00079/1.10726	0.050
ECGF1m -	-.61246	1.636151	.289233	-1.20236/0.02257	0.042

ECGF1p					
DPDm-DPDp	-.85090	1.378825	.243744	-1.34802/.35378	0.001
MMP9m-MMP9p	.70973	1.947567	.344284	.00756/1.41190	0.048

Figura: 12 Gráficos Box-Plot de los genes con diferencia estadísticamente significativa





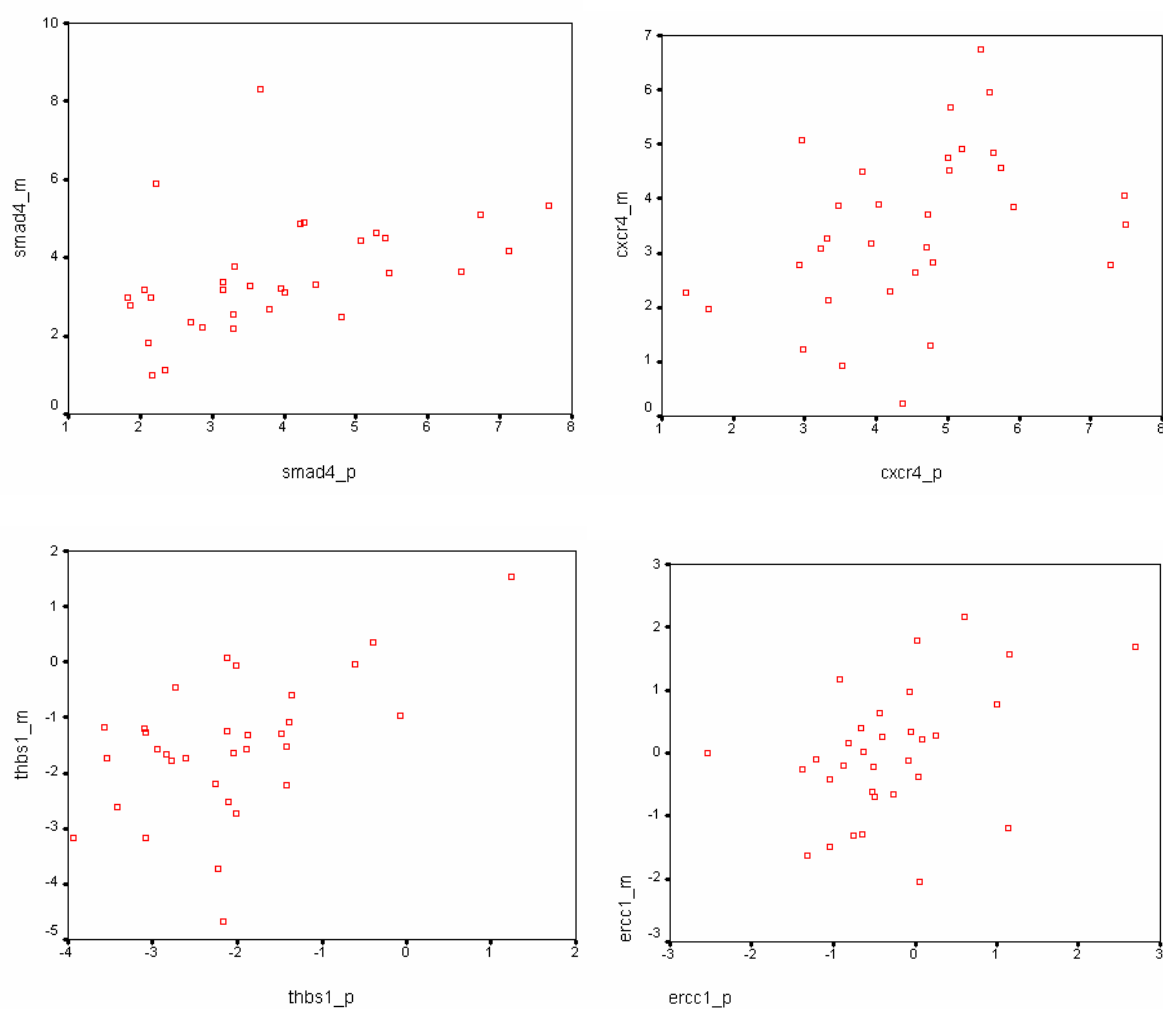
En 6 genes existía un grado de correlación estadísticamente significativo entre el tumor primario y la metástasis hepática (SMAD4, CXCR4, THBS1, ERCC1 y DPYP) (Tabla: 10). Este grado de correlación nos indica que cuando la expresión de un gen tiende a aumentar en el tumor primario lo hace en la misma proporción en la metástasis, independientemente de sus niveles de expresión. Esto ocurría con las parejas CXCR4, THBS1 y DPYP, las cuales presentaban una diferencia de expresión y un grado de correlación estadísticamente significativo. Por el contrario, en el caso de los genes SMAD4, ERCC1 y VEGF donde la diferencia de expresión no fue significativa, esta correlación nos indica que el grado de expresión tiende a ser parecido. El grado de correlación de la MMP9 presentaba además una cierta tendencia significativa ($r=0.309$, $p= 0.085$) (Figura: 13).

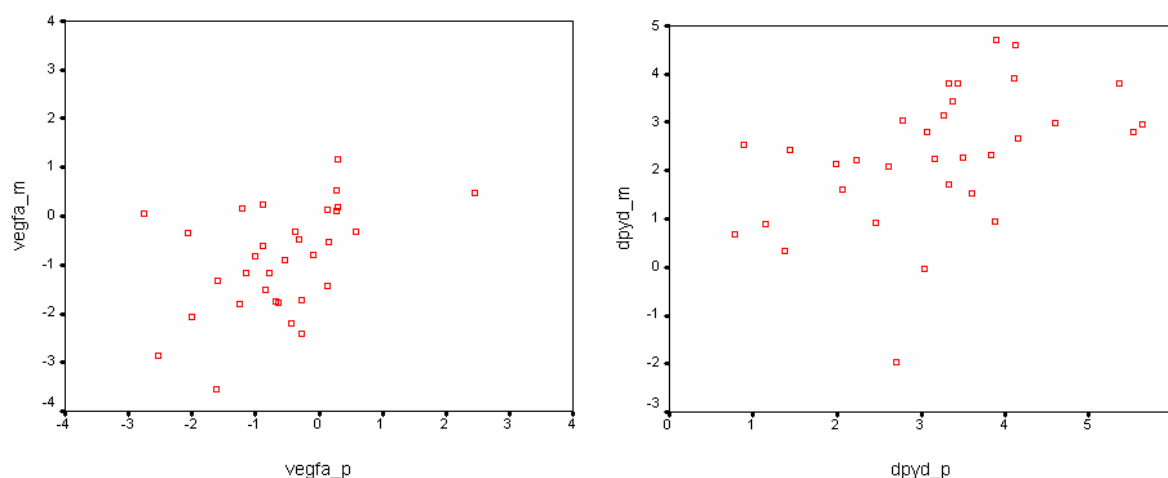
Tabla: 10 Estudio de correlación entre las expresiones de los genes estadísticamente significativos.

Parejas de genes	Correlación	P
SMAD4m&SMAD4p	.447	.010

CXCR4m&CXCR4p	.386	.029
THBS1m&THBS1p	.547	.001
ERCC1m&ERCC1p	.423	.016
VEGFm&VEGFp	.453	.009
DPDm&DPDp	.473	.006

Figura: 13 Gráficos de correlación de las expresiones génicas estadísticamente significativas





9.3 Análisis de la vía EGFR

9.3.1 Concordancia del estado mutacional de KRAS

En 100 tumores primarios y en sus correspondientes metástasis hepáticas se pudo realizar la determinación del estado mutacional de KRAS. Las mutaciones se detectaron en 39 (39%) tumores primarios y en 42 (42%) metástasis. Las mutaciones estaban localizadas en los codones 12 y 13 del exon 2. Se encontró una concordancia entre los tumores primarios y las metástasis en 94 muestras (94%, $k=0.835$, $p<0.0001$). De los 61 primarios que fueron wild type, 55 también fueron nativos en las metástasis (90% de concordancia). Estos 61 primarios con KRAS wild-type fueron posteriormente analizados para determinar la expresión de EGFR y el resto de mediadores de esta vía.

9.3.2 Concordancia del resto de marcadores (Tabla: 11)(Figura: 14)

EGFR. Pudimos obtener la determinación de EGFR mediante inmunohistoquímica en 60 tumores primarios y en sus correspondientes metástasis. EGFR se expresaba en 24 (40%) de los tumores primarios y en 36 (60%) de sus metástasis. Se observó

concordancia en 37 parejas (61%, $k=0.294$, $p=0.006$). De las 23 parejas discordantes, 18 presentaban expresión de EGFR en la metástasis pero no en los primarios.

BRAF. El estado mutacional de BRAF se pudo obtener en 60 tumores primarios y en sus correspondientes metástasis a distancia. Sólo se encontró mutación de BRAF en un paciente (1.6%) y fue la misma (sustitución de valina por ácido glutámico en el codon 600) en el primario que en la metástasis ($k=1$, $p<0.0001$).

PIK3CA. Se determinó el estado mutacional de PIK3CA en 60 tumores primarios y en sus correspondientes metástasis. Se detectaron mutaciones en 4 (7%) de los tumores primarios y en 6 (10%) de metástasis. Se obtuvo concordancia entre el tumor primario y las metástasis en 56 parejas (94%) ($k=0.635$, $p<0.0001$).

PTEN. Se realizó la determinación de PTEN en 60 tumores primarios y en sus correspondientes metástasis. En 14 muestras (23%) de los tumores primarios y en 18 (30%) de las lesiones metastásicas no se observó inmunoreactividad de PTEN. Se obtuvo concordancia en 40 parejas (66%) ($k=0.470$, $p<0.0001$).

pAKT. Se pudo determinar mediante inmunohistoquímica en 60 primarios y en sus correspondientes metástasis hepáticas. Encontramos una sobreexpresión de pAKT en 38 (63%) de tumores primarios y en 44 (73%) metástasis. Estos resultados muestran un bajo grado de concordancia (en 32 parejas, 53%) ($k=0.067$, $p=0.565$).

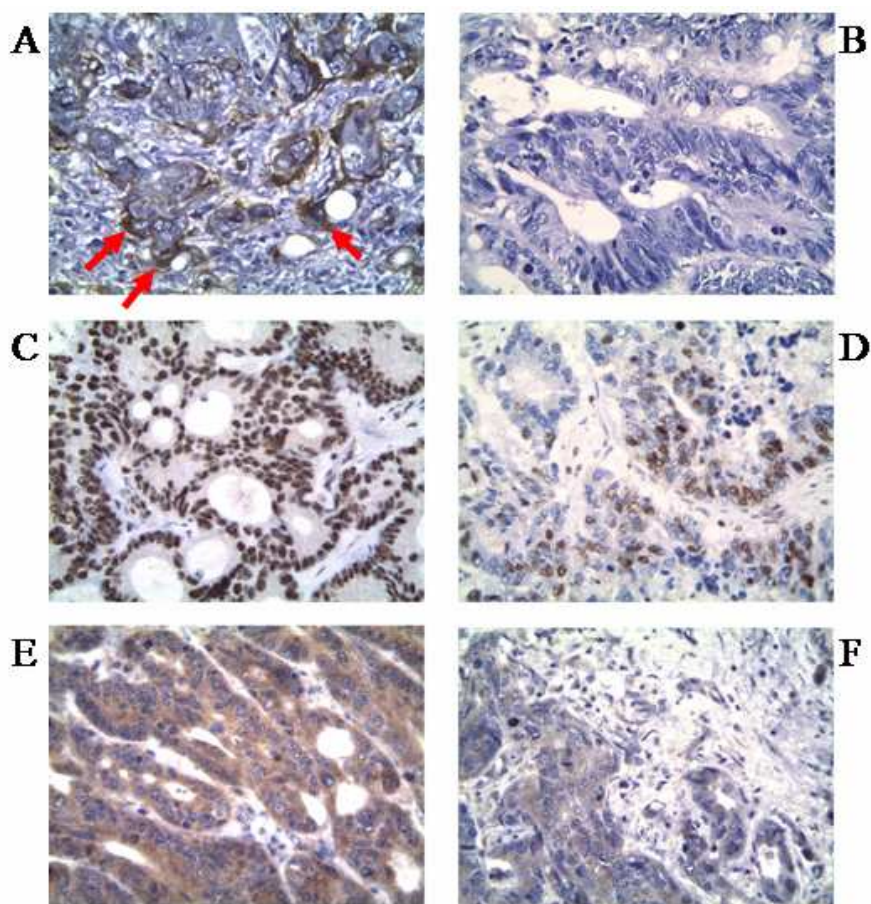
Tabla: 11 Alteraciones en los tumores con KRAS nativo.

Gen	N total	Mutación/Alteración tumor primario n/%	Mutación/Alteración metastasis n/%	Concordancia (%)	Índice kappa	p
KRAS	100	61 (61%)	58 (58%)	94%	0.835	<0.0001
BRAF	60	1 (1.6%)	1 (1.6%)	100%	1	<0.0001
PIK3CA	60	4 (7%)	6 (10%)	94%	0.635	<0.0001
PTEN	60	14 (23%)	18/30%	66%	0.470	<0.0001
Pakt	60	38 (63%)	44 (73%)	53%	0.067	0.565
EGFR	60	24 (40%)	36 (60%)	61%	0.294	0.006

9.3.3 Combinación de marcadores

De los 60 tumores primarios con KRAS wild type, 11 casos 18% no tenían ninguna alteración en ninguno de los seis marcadores (EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA, pTEN y pAKT). Entre ellos, sólo 4 (6.6%) de las lesiones metastásicas fueron negativos para los mismos marcadores ($p=0.03$). Hubo 40 tumores primarios (66%) cuádruples negativos: es decir, que no mostraban ninguna mutación en KRAS, BRAF, PIK3CA ni pérdida de expresión en PTEN. De ellos, sólo 28 (47%) fueron cuádruples negativos en las metástasis ($p=0.04$).

Figura: 14 Muestras en inmunohistoquímica de la tinción de EGFR, pAKT y PTEN.



A: tinción de EGFR positiva en las células del frente invasivo de la metástasis (flechas rojas). B: tinción de EGFR negativa de las células tumorales en el correspondiente tumor primario. C: ejemplo de positividad para la tinción de pAKT. D: ejemplo de tinción negativa de pAKT. E: ejemplo de tinción positiva para PTEN. F: Ejemplo de tinción negativa para PTEN.

9.4 Evaluación de los sistemas pronósticos para SLEy SG tras la resección de metástasis hepáticas

La tercera parte de nuestro trabajo consistió en utilizar los resultados de nuestro estudio para realizar la validación de los principales sistemas pronósticos diseñados para predecir la supervivencia tras la resección de metástasis hepáticas. De los ocho sistemas pronósticos más relevantes se pudo realizar la validación en cinco de ellos con los resultados de las variables incluidas en nuestra muestra.

1. Evaluación del sistema pronóstico de Fong y colaboradores (Fong, Y. 309-18).

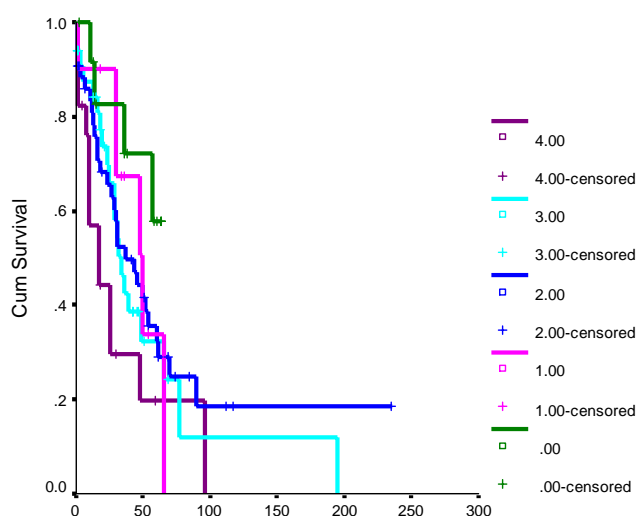
Fong y colaboradores realizaron un sistema pronóstico incluyendo cinco factores como marcadores pronósticos adversos: primarios con invasión ganglionar (estadio III), intervalo libre de enfermedad (ILE) inferior a 12 meses, número de metástasis mayor de 1, tamaño de las metástasis > 5 cm y niveles de CEA prequirúrgico > 200. A cada criterio se le asignó un punto y el score total constituía un predictor de supervivencia. Puesto que en nuestro estudio se perdían algunos pacientes donde no se pudo determinar la presencia de CEA prequirúrgico (los casos más antiguos), realizamos dos validaciones (una con la suma de los cinco factores y otra con la suma de cuatro factores, excluyendo los niveles de CEA).

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA CON CUATRO VARIABLES (invasión ganglionar, ILE < 12 meses, número de metástasis > 1, tamaño de metástasis > 5cm). El análisis de supervivencia del tiempo al seguimiento puede verse en la Tabla: 12. No obtuvimos significación estadística al realizar el test de la tendencia lineal de supervivencia ($p=0.912$) (Figura: 15)

Tabla: 12 Análisis de supervivencia de Kaplan Meier con cuatro variables

Número de factores de riesgo	Número de pacientes	Mediana supervivencia(meses)	IC 95%
0	13	Media: 51	39-62
1	10	50	28-72
2	43	37	18-56
3	33	34	24-44
4	17	17	4-30

Figura: 15 Distribución lineal de supervivencia con la suma de cuatro variables



116 pacientes tenían recogidas las 4 variables. El análisis multivariante mediante regresión de Cox con la suma de las 4 variables detectó un aumento del riesgo de muerte a medida que aumenta la suma de puntos. (Coef Regresión 1.335, $p=0.012$), encontrándose una diferencia en el riesgo de muerte entre los de 0 puntos y los de 4 puntos (Coeficiente de regresión 4.034, $p=0.015$).

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA CON LAS CINCO VARIABLES.

El número de pacientes de nuestra muestra que tienen recogidas las cinco variables y el análisis de supervivencia para el tiempo de seguimiento pueden verse en la (Tabla: 13).

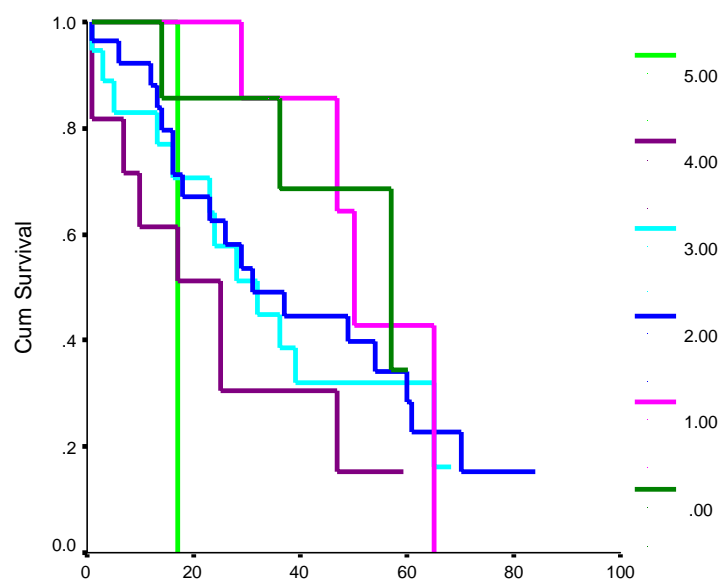
Tabla: 13 Análisis de supervivencia de Kaplan Meier con cinco variables

Número de factores de riesgo	Número de pacientes	Mediana supervivencia(meses)	IC 95%
0	9	57	26-88
1	7	50	44-56

2	27	31	14-48
3	19	32	17-47
4	11	25	11-39
5	1	17	17-17

En el test lineal de supervivencia se aprecia una tendencia al empeoramiento de la supervivencia en función del aumento de puntuación, si bien no se observa una significación estadística ($p=0.214$) (Figura: 16)

Figura: 16 Distribución lineal de supervivencia con la suma de cinco variables



Con el análisis de Cox se objetivó un aumento del riesgo de muerte proporcional al incremento de la suma de puntos (Coef Regresión 1.385, $p=0.017$), detectándose una diferencia significativa en el riesgo de muerte entre los de 0 puntos y los de 4 (odds de muerte = 3.309, $p=0.078$) pero no en los de 5 puntos (odds de muerte = 0.138, $p=0.138$).

2. **Evaluación del sistema pronóstico de Aldrighetti y colaboradores.** (Aldrighetti, L. 555-70) Aldrighetti establece el papel pronóstico independiente de tres variables: grado de diferenciación de la tumoración primaria, niveles de CEA prequirúrgico y el ECOG previo a la cirugía. Nosotros realizamos la validación de este sistema pronóstico con los 75 casos de nuestra muestra que tenían recogidas esas variables (Tabla: 14). En nuestra muestra ninguna de las tres variables adquiría una significación estadística ni en términos de Supervivencia Global ni en términos de Supervivencia libre de enfermedad. Únicamente el CEA prequirúrgico parecía mostrar una cierta tendencia en términos de SLE ($p=0.119$).

Tabla: 14 Regresión de Cox multivariante para SG (negro) y SLE (azul)

Variables	Grado de significación	Coefficiente de Regresión (B)	IC al 95%
Grado diferenciación 1	0.528 0.989		
Grado diferenciación 2	0.926 0.944	1.073 0.949	0.240-4.796 0.217-4.155
Grado diferenciación 3	0.394 0.968	0.341 1.045	0.029-4.044 0.124-8.835
CEA prequirúrgico	0.794 0.119	1.085 1.683	0.586-2.009 0.881-3.025
ECOG 0	0.056 0.469		
ECOG 1	0.529 0.218	0.805 0.656	0.410-1.582 0.336-1.283
ECOG 2	0.020 0.984	23.346 0.000	1.635-333.310 0.000

3. Evaluación del sistema pronóstico de Iwatsuki y colaboradores (Iwatsuky, S. 291-9).

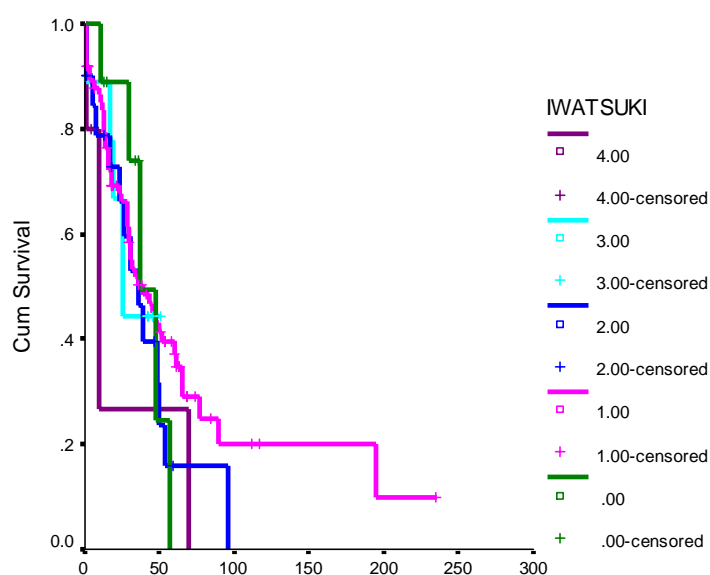
En este estudio se demostró el valor pronóstico independiente de cuatro factores: la presencia de un número de metástasis superior a 3, tamaño de la metástasis mayor de 8 cm, presencia de ILE inferior a 30 meses y la presencia de enfermedad bilobar. A cada variable se le asignó un punto y se dividieron los pacientes en cinco grupos: grupo 1: ausencia de factores de riesgo, grupo 2: presencia de un factor de riesgo, grupo 3: presencia de dos factores de riesgo, grupo 4: presencia de tres factores de riesgo y grupo 5 presencia de los cuatro factores de riesgo. El análisis de supervivencia en nuestra muestra para cada grupo de los formados por el número de factores puede verse en la Tabla: 15.

Tabla: 15 Análisis de supervivencia de Kaplan Meier

Número de factores de riesgo	Número de pacientes	Mediana supervivencia(meses)	IC 95%
0	9	37	22-52
1	75	39	22-56
2	20	36	20-52
3	9	25	16-34
4	5	10	3-17

No obtuvimos significación estadística en el test de tendencia lineal de supervivencia ($p=0.156$) (Figura: 17).

Figura: 17 Distribución lineal de supervivencia.



El análisis multivariante mediante regresión de Cox con cada uno de los factores demostró que la odds de muerte para los pacientes con tamaño de metástasis hepáticas mayor de 8 cm era de 1.96 (IC 95% 1.060-3.635), $p=0.032$), comparado con los pacientes con tamaño de metástasis inferior a 8 cm. El resto de factores de riesgo no se asociaba de forma significativa al riesgo de muerte (Tabla: 16).

Tabla: 16 Análisis multivariante mediante Regresión de Cox

Variabes	Grado de significación	Coficiente de Regresión (B)	IC al 95%
Número metástasis mayor 3	0.899	1.053	0.473-2.342
Tamaño metástasis mayor 8	0.032	1.963	1.060-3.635
Intervalo libre de enfermedad	0.985	0.992	0.448-2.198

Presencia de enfermedad bilobar	0.850	0.937	0.474-1.849
---------------------------------	-------	-------	-------------

4. Evaluación del sistema pronóstico de Ueno y colaboradores (Ueno, H. 59-66).

Ueno y colaboradores establecieron el papel pronóstico independiente de los niveles de CEA > 5, la invasión venosa de la tumoración primaria y la presencia de adenocarcinomas indiferenciados en la tumoración primaria (grado 3).

En el análisis univariante realizado en nuestra muestra (n=117) sólo el número de metástasis se asocia significativamente con el riesgo de supervivencia ($p=0.046$), manteniendo una tendencia a la significación estadística en el análisis multivariante ($p= 0.058$) (Tabla: 17)(Tabla: 18).

Tabla: 17 Estudio de regresión de Cox univariante para supervivencia

Variable	Grado de significación	Coeficiente de Regresión (B)	IC al 95%
Número de metástasis	0.046	1.135	1.002-1.286
Grado diferenciación primario	0.520		
Grado 1	0.306	0.544	0.170-1.743
Grado 2	0.262	0.448	0.110-1.820
Grado 3			
Sincronicidad hepáticas mtx	0.334	1.263	0.786-2.028

Tabla: 18 Estudio de regresión de Cox multivariante para supervivencia

Variable	Grado de significación	Coeficiente de Regresión (B)	IC al 95%
Número de metástasis	0.058	1.130	0.996-1.281
Grado diferenciación primario	0.496		
Grado 1	0.289	0.529	0.163-1.717
Grado 2	0.245	0.434	0.106-1.772
Grado 3			
Sincronicidad mtx hepáticas	0.364	1.250	0.772-2.022

5. Evaluación del sistema pronóstico de Nordlinger y colaboradores. (Nordlinger, B. 1254-62). Nordlinger y colaboradores establecieron el valor pronóstico independiente de seis variables: edad mayor de 60 años, estadio de la tumoración primaria, supervivencia libre de enfermedad, afectación de los márgenes de resección quirúrgicos, tamaño de las metástasis y elevación del CEA prequirúrgico. Pudimos realizar la validación con 118 pacientes en nuestra muestra, en los que se demostró en el análisis univariante que el estadio (III/IV), la afectación de los márgenes quirúrgicos y la elevación del CEA prequirúrgico aumentan el riesgo de mortalidad (Tabla: 19). En el análisis multivariante se mantiene la tendencia a este aumento del riesgo de mortalidad aunque sin alcanzar la significación estadística (Tabla: 20).

Tabla: 19 Estudio de regresión de Cox univariante para supervivencia

Variable	Grado de significación	Coeficiente de Regresión (B)	IC al 95%
Edad >60 años	0.811	1.061	0.655-1.719
Supervivencia libre de enfermedad	0.439	0.993	0.976-1.010
Estadio primario			
Estadios I-II	0.051		
Estadio III	0.024	2.537	1.129-5.701
Estadio IV	0.019	3.483	1.161-5.312
Afectación márgenes quirúrgicos	0.054	0.637	0.403-1.008
Tamaño metástasis >5 cm.	0.304	1.294	0.791-2.115
Niveles de CEA prequirúrgico	0.003	1.007	1.002-1.012

Tabla: 20 Estudio de regresión de Cox multivariante para supervivencia

Variable	Grado de significación	Coeficiente de Regresión (B)	IC al 95%
Edad >60 años	0.372	0.734	0.372-1.448
Tamaño mtx > 5 cm	0.237	0.653	0.322-1.324
Estadio primario			
Estadios I-II	0.070		
Estadio III	0.083	2.497	0.927-6.722
Estadio IV	0.054	2.693	0.879-8.246
CEA prequirúrgico	0.054	1.005	1.000-1.011

Supervivencia libre de enfermedad	0.656	0.994	0.968-1.020
Afectación quirúrgicos márgenes	0.055	0.514	0.261-1.015

9.5 Evaluación de factores pronósticos en nuestra muestra

Puesto que ningún sistema pudo ser completamente validado con los resultados de nuestra muestra, realizamos un estudio para supervivencia libre de enfermedad y para supervivencia global de los factores pronósticos con nuestros hallazgos. Además de las variables clínicas y patológicas incluimos factores moleculares con el fin de determinar si éstos añaden información predictiva a los sistemas pronósticos clásicos.

Para supervivencia libre de enfermedad en el análisis univariante las variables que resultaron tener valor estadísticamente significativo fueron la extensión de la metástasis (< 25%, 25-50% y >50% del parénquima hepático), el tamaño de la metástasis, la administración de tratamiento quimioterápico previo a la resección hepática, la afectación de los márgenes hepáticos, la presencia de fibrosis y de hepatitis, y la expresión de los genes TS y SMAD4, como se muestra en la Tabla: 21. El aumento de expresión de cada uno de estos factores se relacionó con una mayor posibilidad de presentar recidiva (todos presentaban un coeficiente de regresión positivo) excepto la expresión de TS, donde el aumento de su expresión se relacionaba con una disminución del riesgo de recidiva. En el análisis multivariante no se mantuvo la significación estadística en ninguna de las variables clínicas. En cambio, sí conservó la significación estadística la expresión de los dos genes: La

tasa de riesgo para la expresión de TS en la metástasis fue de 0.631 (IC 95% 0.422-0.944), $p=0.025$, y para la expresión de SMAD4 en la metástasis fue de 1.680 (IC 95% 1.047-2.695) $p=0.032$ (Tabla: 22).

Tabla: 21 Variables con valor pronóstico para SLE estadísticamente significativo en el análisis univariante.

Variable	p	Coefficiente de regresión (B)
Extensión de la metástasis	0.061	0.528
Tamaño de la metástasis	0.064	0.064
Administración de neoadyuvancia	0.021	0.558
Afectación de márgenes hepáticos	0.064	0.426
Presencia de hepatitis	0.061	1.132
Presencia de fibrosis	0.009	1.928
Expresión de TS en la metástasis	0.053	-0.252
Expresión de SMAD4 en la metástasis	0.03	0.261

Tabla: 22 Variables con valor pronóstico para SLE estadísticamente significativo en el análisis multivariante.

Variable	Significación	Exp (B)	IC 95%
Expresión de TS en la metástasis	0.025	0.631	0.422-0.944
Expresión de SMAD4 en la metástasis	0.032	1.680	1.047-2.695

Para supervivencia global en el análisis univariante las variables que mostraron tener valor estadísticamente significativo fueron el estadio de la tumoración primaria (I-IV), el valor de CEA previo a la cirugía del primario, la extensión, el tamaño y el número de metástasis, la afectación de los márgenes quirúrgicos, la

presencia de fibrosis y la expresión de SMAD4 y DPD en la metástasis (Tabla: 23). En todos ellos el coeficiente de regresión fue positivo, es decir, que el aumento de expresión de cada una de las variables se relaciona con un mayor riesgo de éxitus (factores de mal pronóstico). Por el contrario, la expresión de ECGF1 en la metástasis también mostraba una cierta tendencia estadística ($p=0.091$) como factor de buen pronóstico (un aumento de su expresión se relacionó con una disminución del riesgo de éxitus). No obstante, en el análisis multivariante no se mantuvo la significación estadística de ninguna de estas variables.

Tabla: 23 Variables con valor pronóstico para SG estadísticamente significativo en el análisis univariante

Variable	P	Coeficiente de regresión (B)
Estadio tumoración primaria	0.027	0.346
Valor de CEA del primario	0.003	0.007
Extensión de las metástasis	0.002	0.823
Tamaño de las metástasis	0.026	0.074
Número de metástasis	0.046	0.127
Afectación márgenes quirúrgicos	0.054	0.451
Presencia de fibrosis	0.012	1.886
Expresión de SMAD4 en la metástasis	0.086	0.159
Expresión de DPYP en la metástasis	0.053	0.373

DISCUSIÓN

10 DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS

10.1 Elección del perfil génico.

La elección de los 19 genes en los que está basado este trabajo se realizó tras una exhaustiva revisión de la literatura al respecto. Se eligieron por un lado genes cuya expresión ha demostrado jugar un papel importante en el proceso de tumorigénesis y metastatización a distancia. El racional de esto fue que la comparación del perfil de expresión génica en los diferentes estadios de la enfermedad (representados por el primario y la metástasis a distancia) aporta una gran información para caracterizar de forma dinámica el proceso carcinogénico en las distintas etapas de la progresión tumoral (Nadal, Maurel, and Gascon 5832-44). Por otro lado, se determinaron una serie de genes relacionados con la sensibilidad y resistencia de los citostáticos más frecuentemente utilizados en el tratamiento del cáncer de colon (fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecán y los fármacos anti-EGFR). Ésto persigue la identificación de potenciales dianas terapéuticas.

Hasta la fecha existen pocos trabajos en la literatura que comparen el perfil de expresión génica entre primarios y metástasis (Koh et al. 92-101; Barbier et al. E9-E15), y ninguno con la cantidad de genes analizada en nuestra muestra.

El conocimiento de las diferencias de expresión génicas entre la tumoración primaria y las metástasis a distancia es de suma importancia en el momento actual puesto que son las terapias dirigidas en función de las características moleculares del tumor las que han demostrado una mayor eficacia. Generalmente, la elección del tratamiento en la enfermedad metastásica se realiza teniendo en cuenta el estudio molecular de la tumoración primaria, pero se desconoce en qué medida la

expresión génica del primario es un reflejo de lo que ocurre en la metástasis a distancia. Para seleccionar el fármaco más adecuado, debemos conocer los diferentes perfiles génicos en los diversos estadios de la enfermedad.

10.2 Procesamiento y análisis de los genes.

Cuando se realiza la determinación de la expresión génica es imprescindible realizar controles de calidad que garanticen un correcto procesamiento de la muestra. En nuestro estudio se determinó la concentración y pureza del ARN por espectrofotometría y, además, se realizó un segundo control mediante electroforesis en geles de agarosa. Posteriormente se debe realizar una normalización para comparar los niveles de expresión de cada ARNm. Existe una amplia variabilidad entre los protocolos utilizados para el aislamiento del ARN y el paso posterior a ADNc, lo cual puede originar diferencias de expresión (Tricarico et al. 293-300). Además, el uso de tejido fijado y parafinado como fuente de ácidos nucleicos requiere el uso de diversos controles de calidad. Los ácidos nucleicos extraídos de tejidos fijados suelen estar degradados y la eficiencia de la preparación del ADNc puede variar entre distintos tejidos. Dado que la medida del ARN no siempre permite predecir la cantidad de ADNc que finalmente estará en la reacción, es necesario utilizar genes endógenos (genes cuya expresión no varía a lo largo del proceso tumoral), que servirán como control de posibles variaciones en los ADNc de inicio. De esta forma, las variaciones en los genes endógenos reflejarán variaciones en los ADNc de partida y no verdaderos cambios de expresión debidos a la enfermedad. Cuando se normaliza frente a ellos se resta la influencia de las variaciones de los ADNc de partida y se resaltan los verdaderos cambios de

expresión génica potencialmente debidos al proceso tumoral en sí. Estos genes nos permitirán normalizar, es decir, ajustar en función de la cantidad. Hasta la fecha no se ha determinado qué gen de referencia es el más fiable, puesto que existe una variabilidad intrínseca a la técnica y al tipo de muestra. Además, el nivel de expresión de ARNm de los genes considerados de referencia presenta una cierta variabilidad (Bustin 23-39). Por tanto, es necesario hacer un estudio de la estabilidad de los endógenos específicamente para el tipo de tejido que se utiliza. En nuestro trabajo incluimos 3 genes de referencia, también denominados “housekeeping”: PSMB4, GAPDH y B2M. dado que, con anterioridad, nuestro grupo ha realizado un estudio de la estabilidad de múltiples endógenos en el cáncer colorrectal utilizando el algoritmo GENORM (Poppe B et al. 18 3(7)).

10.3 Técnica de qRT-PCR.

El empleo de la qRT-PCR en tarjetas microfluídicas presenta importantes ventajas sobre el resto de técnicas de expresión génica. Es una técnica altamente sensible. Además, posibilita el análisis simultáneo de varios genes. Sus resultados son cuantitativos, por lo tanto fácilmente reproducibles. No requiere manipulación post-amplificación puesto que gracias a la sonda de fluorescencia monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. Finalmente, si bien lo ideal es realizar la técnica en la obtención del tejido en fresco y posteriormente congelado a -80°C, se puede realizar su determinación en bloques de tejido fijado y conservados en parafina (Kuramochi et al. 825-31). En nuestro estudio se seleccionaron 121 pacientes diagnosticados de cáncer CCR con metástasis hepáticas resecadas entre los años 1990 y 2007. Se realizó una revisión en profundidad del

historial clínico de los pacientes considerando factores clínicos, analíticos e histológicos. En un principio se planteó realizar la determinación de los 19 genes por duplicado en todos los pacientes (determinación en el primario y en su correspondiente metástasis a distancia). No obstante, nos enfrentamos a numerosas dificultades técnicas con la PCR. De los 121 pacientes con los que contábamos al inicio del estudio, sólo se obtuvieron determinaciones génicas en 63 pacientes (bien en el primario, o bien en la metástasis) y de estos 63 pacientes sólo en 32 se consiguió la determinación simultánea de los genes en ambas muestras (primario y metástasis). Nuestra muestra quedó por lo tanto ampliamente limitada. Se han planteado varias hipótesis que justifiquen estas dificultades técnicas. En primer lugar, el año de la cirugía (y la toma de biopsia). De los 32 pacientes donde se consiguieron realizar ambas determinaciones génicas, 22 fueron intervenidos de la metastasectomía entre el 2000 y el 2006. Así pues, el año de conservación de los tejidos pudo ser un factor determinante. En los pacientes intervenidos con anterioridad al 2000 sólo se ha podido realizar la determinación génica en 10 pacientes, lo que nos plantea dudas acerca del procedimiento de conservación de las muestras en las biopsias más antiguas. Pese a los trabajos publicados con muestras en parafina (comentado previamente), para aumentar la sensibilidad y especificidad de la PCR se recomienda la utilización de muestras conservadas en fresco (práctica habitual en pocos centros hasta el momento). En nuestro trabajo, todas las muestras que obtuvimos habían sido conservadas en bloques de parafina, lo cual a su vez pudo disminuir la sensibilidad de la técnica. También se ha barajado la posibilidad de que el mal estado de las muestras se deba a

contaminación extrínseca. El colon y el recto, a diferencia de otros tejidos como la mama, el pulmón o el aparato genitourinario, está en contacto permanente con gérmenes que pueden deteriorar la conservación de la muestra. La experiencia de nuestro equipo de trabajo avala esta hipótesis, puesto que numerosos trabajos previos realizados en nuestro laboratorio con tejidos parafinados procedentes de tejido no colorrectal no revistieron dificultades técnicas (Cejas, P. 681-7).

Por el contrario, la determinación de los análisis mutacionales y los estudios de IHQ no presentaron especiales dificultades. En estas muestras se estudió directamente el ADN, que presenta una mayor estabilidad frente al ARN. Además, se emplea el paraformaldehído para fijar las proteínas siendo así susceptibles de ser estudiadas mediante distintas tinciones (inmunohistoquímica).

En la literatura no existen muchos trabajos que comparen el perfil de expresión génica entre los primarios de colon y las metástasis (Tabla: 24) o la correlación de las moléculas de la vía EGFR (Tabla: 25).

Tabla: 24 Series con análisis de concordancia de genes entre primario y metástasis

Estudio	Genes	N	Año	Técnica	Expresión ARNm en mtx vs expression en primarios
Inokuchi et al (Inokuchi, N. et al. 391-96)	TS, DPD, TP, UP, OPRT	23	2004	qPCR	Aumento de DPD (p=0.0053) OPRT (p=0.016), TP (p=0.00014), UP (p=0.0026). No diferencias de expresión de TS (p=0.28) Ausencia de correlación de TS (p=0.48), DPD (p=0.94), OPRT (p=0.19), TP (p=0.81), UP (p=0.90).
Kuramochi et al (Kuramochi, H et al. 522-6).	DPD, TP, TS, OPRT	31	2006	qPCR	Ausencia de significación en las diferencias de expresión. Correlación de DPD y TP en

					primarios ($r_s=0.38$, $p=0.03$) y en metástasis ($r_s=0.72$, $p<0.0001$)
Kobayashi et al (Kobayashi, H et al. 1257-62)	TS, ERCC1	31	2008	qPCR	Correlación de TS ($r_s=0.875$, $p=0.0024$) y ERCC1 ($r_s=0.835$, $p=0.0038$) en primarios con mtx hepáticas sincronas.
Guichard et al (Guichard, S et al. 364-70)	Topo I	8	1998	Cualitativa	Disminución actividad ($p<0.001$).
Ghadjar et al. (Ghadjar, P et al. 1910-16)	CCR6	16	2006	IHQ	Disminución de expresión ($p=0.02$).
Kim et al. (Kim, J et al. 2744-53)	CCR4	39	2005	qPCR	Aumento de expresión ($p<0.0001$).
Kuramochi et al (Kuramochi, H et al. 29-33)	VEGF	31	2006	qPCR	No diferencia de expresión ($p=0.989$) Presencia de correlación ($r_s=0.663$, $p<0.0001$).
Chen et al (Chen, J et al. 1555-63)	c-erbB2, VEGF	44	2010	IHQ	No diferencia de expresión de c-erbB2 ($p=0.503$) ni de VEGF ($p=0.285$).
Illemann et al. (Illemann, M et al. 293-302)	MMP9	15	2006	IHQ	Diferente patrón de crecimiento en la mtx y en el primario
Illerman et al (Illemann, M et al. 1860-70)	uPAR, uPA, PAI-1,	14	2009	IHQ	Diferente patrón de crecimiento en la mtx y en el primario
Backus et al (Backus, HH. et al. 206-11)	TS, p53, Rb, FasR, FasL, bcl-2, mcl-1, bax, bcl-x, Ki-67	8	2002	IHQ	Aumento de expresión de TS ($p=0.004$) y Ki-67 ($p=0.016$). Disminución expresión Rb ($p=0.024$). Ausencia expresión Fas en mtx y primarios. Cambios en patrones expresión Bax, mcl-1 y bcl-xl.
Kuramochi et al (Kuramochi, M et al. 825-31)	EGFR	31	2010	qPCR	No diferencia de expression ($p=0.99$). Presencia de correlación ($r_s=0.78$, $p<0.0001$)
Koh et al (Koh, K.H. et al. 92-	80 genes	12	2008	microarrays	Similar perfil génico de expresión

101)					Diferente expresión en genes individuales
------	--	--	--	--	---

Tabla: 25 Series de concordancia de los genes relacionados con la vía EGFR

Estudio/año	Genes	N	Mutaciones primario	Mutaciones metastasis	Grado de concordancia
Santini y cols/ 2008 (Santini et al. 1270-75)	KRAS	107	38.4%	36.4%	96% (IC 95%, 90%-99%)
Cejas y cols/2009 (Cejas et al. e8199)	KRAS	110	34%	36%	94% (kappa 0.86)
Etienne-Grimaldi y cols/2008 (Etienne-Grimaldi et al. 4830-35)	KRAS	93	33.4%	38.7%	100%
Italiano y cols /2010 (Italiano et al. 1429-34)	KRAS BRAF	95	37% 3%	40% 4.5%	95% 97%
Loupakis y cols /2009 (Loupakis et al. 2622-29)	KRAS EGFR pAKT PTEN	43 41 47 45	40%	44%	95% (IC95%, 84%-99%) 80% (IC 95%, 68%-92%) 68% (IC 95%, 53%-81%) 60% (IC 95% 46%-74%)
Molinari y cols/2009 (Molinari et al. 1087-94)	EGFR KRAS BRAF PTEN	38 38 38 38	43% 6%	40% 6%	92% 100% (kappa 1) 89%

11 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

11.1 Genes relacionados con el metabolismo de fármacos: Timidilato Sintasa (TS), Dihidropirimidin Deshidrogenasa (DPD) y Timidin Fosforilasa (TP).

En este trabajo evaluamos la correlación entre el grado de expresión de mRNA de tres enzimas relacionadas con el metabolismo del 5 FU: timidilato sintasa (TS), Dihidropirimidin Deshidrogenasa (DPD) y timidilato fosforilasa (TP) entre los tumores primarios y sus correspondientes metástasis hepáticas. En nuestro estudio 22 pacientes de los 32 en los cuales se había realizado la determinación génica habían recibido adyuvancia basada en fluorouracilo. Por ello, los resultados obtenidos servirían para investigar cómo los tumores de origen colorrectal pueden adquirir resistencia al fluorouracilo durante el desarrollo de metástasis a distancia. En este punto nuestro trabajo puede presentar una pequeña limitación puesto que algunos tumores pueden presentar una resistencia farmacológica intrínseca, y no ser secundaria al tratamiento recibido, si bien esto no condiciona globalmente los resultados obtenidos.

En nuestro trabajo encontramos una diferencia de medias estadísticamente significativa entre la expresión del gen en la metástasis hepática y el tumor primario tanto en el caso de la TP (diferencia de medias: -0.612, $p=0.042$) como de la DPD (diferencia de medias: -0.850, $p=0.001$). En ambos se produce una sobreexpresión génica en el tumor primario respecto a su expresión en el tejido hepático. En el caso de la DPD, además, el grado de correlación es estadísticamente significativo ($r_s = 0.473$, $p=0.006$), lo que indica que cuando se produce una variación de expresión génica de este gen en el primario tiende a

producirse esa misma variación en la metástasis a distancia, aunque cuantitativamente la expresión de ambos sea muy diferente. En cambio, esta correlación no la encontramos en el caso de la TP ($r_s=0.259$, $p=0.152$). En relación a la diferencia de expresión de la TS, no se han encontrado diferencias de expresión ES entre tumoración primaria y metástasis a distancia (diferencia de medias: 0.275, $p=0.490$). Tampoco resulta ES el grado de correlación ($r_s=-0.30$, $p=0.871$).

Nuestros resultados contrastan con los descritos en la literatura. Un estudio realizado en xenotransplantes (Okumura et al. 875-82) encontró diferencias de expresión tanto en la TP como en la DPD, pero, opuestamente a nuestro trabajo, el gen se sobreexpresaba más en la metástasis que en la tumoración primaria. El perfil de expresión de la TS era similar en ambas muestras. Inokuchi et al encontraron resultados similares en 23 pacientes: tanto la DPD como la TP presentaban una sobreexpresión génica ES a favor de la metástasis hepática. En este trabajo no se halló correlación en ninguno de los genes (Inokuchi et al. 391-96). Con estos resultados se podría plantear la hipótesis de que tanto la DPD como la TP juegan un papel en la adquisición de resistencia al fluorouracilo durante el desarrollo de metástasis a distancia. Sin embargo, resultados de otros estudios (Kuramochi, H. 825-31) no muestran diferencias ES en la expresión génica de ninguno de los genes, aunque en el caso de la TS sí se objetivó que la correlación de ambos era ES.

Esta discrepancia objetivada en la literatura podría atribuirse a diferencias en la técnica empleada (Okumura et al utilizaron una RT-PCR convencional, mediante un gel de agarosa, mientras que Inokuchi et al emplearon la Taqman RT-PCR, más

precisa y reproducible) o a diferencias en la muestra (xenotransplantes en ratones en el caso de Okumura y pacientes en el resto).

Una mayor expresión de las enzimas relacionadas con el metabolismo del 5 FU se ha asociado a una mayor resistencia al fármaco. La elevación de TP en los tumores primarios se ha relacionado tanto con una mayor resistencia al 5 FU (Metzger et al. 2371-76) como con un aumento de sensibilidad al 5 FU (Evrard et al. 1726-33). La misma discordancia rige para la TS: algunos autores afirman que una alta expresión de este gen se correlaciona con una mayor resistencia al fluorouracilo (Johnston et al. 1407-12; Cascinu et al. 239-44), mientras que otros postulan que la elevación de la TS se relaciona con un beneficio tras el empleo de 5 FU (Edler et al. 1721-28; Johnston et al. 2640-47). En el caso de la DPD existe menos controversia. Niveles elevados se han relacionado con una mayor resistencia al tratamiento con 5 Fluorouracilo y Capecitabina (Kobayashi et al. 144-48; Tsuji et al. 531-36), mientras que su déficit se asocia a una importante toxicidad al tratamiento con 5 FU (Lyss et al. 239-40) debido a dificultad para la degradación del fármaco.

Nuestros resultados sugieren una hipótesis diferente. La mayor expresión génica que hemos objetivado en los primarios de TP y DPD puede ser indicativa de que los tumores primarios tienen un comportamiento biológico distinto. Estas diferencias pueden ser las que les confiera su potencial capacidad para el desarrollo de metástasis a distancia y plantea la hipótesis de que los tumores primarios se desarrollen a partir de las “cancer stem cells”, células más resistentes a la Quimioterapia y que pueden originar metástasis a distancia. (Pardal, Clarke, and Morrison 895-902; Kondo, Setoguchi, and Taga 781-86). De esta forma, en los

tumores primarios se encuentra una población minoritaria de células que pueden renovarse por sí mismas (las stem cells). Estas células serían las responsables del crecimiento intrínseco del tumor (con capacidad de autorregeneración) y, por otro lado, del crecimiento y desarrollo de células diferenciadas con potencial metastático (Burkert, J. et al. 287-297). Por ello, esta heterogeneidad celular en la tumoración primaria podría ser la responsable de la sobreexpresión de TP y de DPD, de originar una mayor resistencia al 5 Fluorouracilo y, finalmente, desarrollar metástasis a distancia. No obstante, este razonamiento debe considerarse una hipótesis de trabajo y una base para trabajos posteriores puesto que las stem-cells sólo representan el 1-2% del total de las células tumorales.

En relación a la TS, en nuestros pacientes no se han encontrado diferencias ES entre la expresión génica del primario y de la metástasis ($p=0.490$). No obstante, puesto que el grado de correlación tampoco fue estadísticamente significativo, no podemos afirmar que la expresión del primario sea similar a la de la metástasis, por lo que el análisis del primero no debería usarse para valorar la expresión génica en la metástasis. Por el contrario, la TS demostró ser un factor de mal pronóstico en el análisis de la SLE (coeficiente de regresión = -0.252 , $p=0.053$), resultados que relacionan una mayor expresión de la TS con un mejor pronóstico tras la resección de metástasis hepáticas. No obstante, los estudios realizados hasta ahora no son concluyentes. Muchos de ellos, incluso, la relacionan con un peor pronóstico (Popat, Matakidou, and Houlston 529-36). Por lo tanto, se requieren estudios adicionales con metodología consistente para definir el verdadero valor pronóstico de la TS.

Esta ausencia de sobreexpresión tanto de TS como de TP y de DPD en la metástasis, podrían justificar los buenos resultados conseguidos con la administración de quimioterapia intraarterial basada en fluoropirimidinas para el tratamiento de las metástasis hepáticas (según un reciente análisis de la Cochrane, la administración de HAI se relacionaba con una mayor tasa de respuestas (42.9% frente a 18.4% para la quimioterapia sistémica) (Mocellin et al. CD 007823).

Glutation S Transferasa (GSTP1) Los polimorfismos de la GSTP-1 están relacionados con una reducción significativa del riesgo de muerte en los tumores de origen colorrectal que han recibido tratamiento con 5 FU/Oxaliplatino (Stoehlmacher et al. 936-42). Por ello se ha sugerido que la GSTP-1 juega un papel importante en la resistencia de los fármacos basados en platino (Ban et al. 3577-82; Nishimura et al. 1859-65). Goto y colaboradores (Goto et al. 549-58) demostraron que la GSTP-1 se encuentra implicada directamente en la detoxificación del cisplatino mediante la formación de adductos de cisplatino-glutation, poniendo de manifiesto la función de esta enzima en la adquisición de resistencia a los compuestos de platino. Se ha observado que una disminución de su actividad se relaciona con una mayor actividad de estos fármacos, lo que supone a su vez una mejor supervivencia en los pacientes tratados con platinos. No obstante, la funcionalidad de esta enzima sólo se relaciona con el cisplatino y su papel en el metabolismo del oxaliplatino todavía no ha podido demostrarse in vitro (Stoehlmacher et al. 936-42)

Los resultados de nuestro trabajo muestran que el grado de expresión de GSTP-1 es mayor en la metástasis hepática respecto al tumor primario (diferencia de medias

0.55324, $p=0.05$). El grado de correlación no fue estadísticamente significativo entre ambas determinaciones de genes ($p=0.274$). Este aumento de la expresión génica en la metástasis podría significar un incremento de resistencia al oxaliplatino producido durante el desarrollo de las metástasis a distancia. No obstante, sólo 5 de los 32 pacientes habían recibido tratamiento previo con oxaliplatino en adyuvancia, por lo que el mecanismo por el que se sobre-expresa en las metástasis no es evidente. En cambio, la mayoría de los pacientes (22/32) sí habían recibido tratamiento adyuvante basado en 5 FU, por lo que quizás la GSTP-1 podría estar en cierta manera implicada en el metabolismo de las fluoropirimidinas, aunque al respecto todavía no hay ningún estudio que lo confirme (Stoehlmacher et al. 936-42).

ERCC1. La proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1, también conocida como ERCC1, es una nucleasa que pertenece a la vía de reparación de la escisión de los nucleótidos (Metzger et al. 309-16). Esta enzima juega un papel importante en la reparación del ADN tras la acción de la quimioterapia basada en platino.

Shirota y colaboradores demostraron que los niveles de ERCC1 y TS predecían la supervivencia de pacientes con CCR que habían recibido tratamiento con 5 FU y oxaliplatino: pacientes con baja expresión en ambos genes presentaban una supervivencia media de 11.1 meses (IC 95%, 8,4-17.5 meses) frente a 1.9 meses (IC 95%, 1.1-4.9 meses) observada en aquellos con una alta sobreexpresión (Shirota et al. 4298-304).

En relación a las diferencias de expresión entre el primario y la metástasis hepática, en nuestro trabajo no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ERCC1 entre el primario y la metástasis hepática (diferencia de medias 0.298, $p=0.121$). Además, el grado de correlación entre ambos fue significativo ($r_s=.423$, $p=0.016$). En la literatura encontramos resultados similares. Así, Kobayashi et al (Kobayashi et al. 1257-62) compararon los niveles de expresión de TS y de ERCC1 en 31 pacientes con CRC con metástasis hepáticas que habían recibido tratamiento basado en 5-FU y oxaliplatino. Encontraron un alto grado de correlación de los niveles de ERCC1 en los tumores primarios y en las metástasis hepáticas síncronas, no así en las metácronas. Aunque los autores no reflejan la causa de esta diferencia de correlación en función de la sincronidad de las metástasis, se podría hipotetizar que en la enfermedad metácrona se pueden acumular una serie de cambios genéticos producidos en un intervalo de tiempo o secundarios al efecto de los distintos tratamientos. De manera similar, en nuestra muestra 20/32 pacientes presentaban enfermedad síncrona y sólo 12/32 enfermedad metácrona. Mientras que Kobayashi y colaboradores establecieron que los niveles de expresión de TS y de ERCC1 en el tumor primario pueden predecir el pronóstico de los pacientes tratados con 5 FU-Oxaliplatino, debido al escaso número de pacientes que recibieron tratamiento con oxaliplatino en adyuvancia en nuestra muestra nos es difícil establecer el papel de ERCC1 como factor predictivo de respuesta. Sin embargo, con nuestros resultados podríamos concluir que la determinación de los niveles de mRNA en el tumor primario refleja su actividad en la enfermedad metastásica, fundamentalmente en la enfermedad síncrona.

Topoisomerasa I. La DNA topoisomerasa I es una enzima nuclear importante para solucionar problemas que se producen en la reparación de errores ocurrida durante la replicación del ADN y otras funciones celulares. Además, se ha identificado como la principal diana del Irinotecán. En relación con su papel predictivo, y aún a falta de estudios prospectivos randomizados, estudios preliminares han demostrado que una alta expresión de Topoisomerasa I en células de primarios de origen colorrectal, mejora la supervivencia global en pacientes tratados con Irinotecán (HR = 0.47, 95% CI 0.23-0.94, $p = 0.033$) (Kostopoulos et al. 339). Algunos autores han descrito un aumento de su actividad en tejido tumoral comparado con tejido colónico sano (Giovanella et al. 1046-48). Estudios posteriores corroboran estos resultados, y demuestran además que la actividad de la topo-I disminuye según va avanzado el estadio de la enfermedad, fundamentalmente en las metástasis hepáticas donde se ha observado que su actividad es significativamente menor que en los tumores primarios (Guichard et al. 364-70). En este estudio además se demuestra que la actividad de la Topo I es menor en la mucosa colónica sana respecto de la tumoral ($p=0.008$, $n=53$) y menor en las metástasis hepáticas que en el tejido hepático sano ($p=0.003$, $n=8$).

La citotoxicidad de los inhibidores de la topoisomerasa depende del nivel de expresión de topo I en las células. Las células que expresan altos niveles de Topo I son hipersensibles a los fármacos inhibidores, mientras que una disminución del nivel enzimático podría ser un factor de resistencia a los mismos (Knab, Fertala, and Bjornsti 22322-30; Benedetti et al. 4343-48). Pensamos que con estos hallazgos podría explicarse la actividad del CPT-11 en la enfermedad metastásica, donde hay

células tumorales (bien en el primario o en las células tumorales metastásicas) con alta expresión de Topo I, y la ausencia de actividad en la enfermedad adyuvante debido a su baja actividad en tejido sano (Guichard et al. 364-70).

En nuestro trabajo la determinación de los niveles de expresión de topoisomerasa I en la metástasis también eran inferiores a los del primario (diferencia de medias - 0.4780), aunque no fue estadísticamente significativo ($p=0.171$), probablemente debido al bajo tamaño de la muestra. El grado de correlación entre ambas determinaciones tampoco alcanzó la significación estadística ($r_s=0.152$, $p=0.405$).

No obstante, y a pesar de la falta de significación estadística, nuestros resultados muestran una tendencia hacia una menor expresión de la actividad de dicha enzima en la enfermedad metastásica, hallazgos similares a los de la literatura. Se podría plantear la hipótesis de que la expresión y la actividad de la topoisomerasa I disminuyen conforme aumenta la agresividad tumoral y el potencial metastático del tumor, por lo que podría comportarse como un marcador pronóstico (una baja expresión génica se relacionaría con una enfermedad más agresiva y por lo tanto con un peor pronóstico). No obstante, se necesitarían mayores estudios prospectivos que confirmen esta teoría.

11.2 Citoquinas

CXCR4. Se ha demostrado que una alta expresión de CXCR4 determinada en tumores primarios de origen colorrectal está relacionada con un peor pronóstico en estos pacientes (Kim et al. 2744-53). En este estudio una alta expresión de CXCR4 en pacientes con CCR en estadios I y II constituía un factor de riesgo independiente

para desarrollar metástasis hepáticas o recurrencias locales. Simultáneamente, en los pacientes con CCR en estadio IV, aquellos que presentaban una alta expresión de CXCR4 presentaban una peor supervivencia que los tumores con baja expresión. Su determinación en las metástasis hepáticas también ha demostrado hallazgos similares: la supervivencia global de los pacientes que presentan una menor expresión de CXCR4 es mayor que aquellos que presentan una alta sobreexpresión (27 meses vs 10 meses, $p=0.036$) (Kim et al. 113-20).

En relación con las diferencias de expresión entre los tumores primarios y las metástasis, Kim et al (Kim et al. 2744-53) encontraron que CXCR4 se encontraba sobreexpresado en las metastásis hepáticas en aquellos pacientes con enfermedad síncrona. Esto lo justificaban con la teoría de que el hígado, debido a su capacidad órgano-específica para producir CXCL12 (el ligando de CXCR4), puede ser el órgano diana específico para las células que presentan una alta expresión de CXCR4. No obstante, esto entra en confrontación con el hecho de que las células tumorales primarias con una elevada expresión de CXCR4 tienen un potencial mayor para diseminarse de manera local y fundamentalmente hacia los tejidos que sobreexpresan mayor cantidad del ligando CXCL12 (Jordan et al. 1061-69; Dwinell et al. 359-67).

Nuestros resultados, por el contrario, muestran una diferencia de expresión significativa encontrándose mayores niveles de CXCR4 en el tumor primario que en su correspondiente metástasis (diferencia de medias: -1.028, $p=0.001$). Además, ambas expresiones génicas presentan un grado de correlación estadísticamente significativo ($r_s=0.386$, $p=0.029$).

Esta mayor expresión en el primario observada en nuestro trabajo puede justificar el posible papel patogénico de CXCR4 en el desarrollo de las metástasis hepáticas, lo cual justificaría el peor pronóstico de estos pacientes observado en estudios previos (Kim et al. 113-20). Así, una mayor expresión de CXCR4 en las células tumorales podría facilitar la atracción de estas células por parte del ligando hepático CXCL12, sobreexpresado en el área periportal del hígado (Burger, JA. 1761-7). La menor expresión de CXCR4 que observamos en el parénquima hepático podría ser el resultado de su internalización y degradación hepática tras su unión con el receptor (Neel et al. 637-58).

Nuestros resultados corroboran, por lo tanto, la hipótesis de que la citoquina CXCR4 juega un papel importante en el desarrollo de metástasis hepáticas. A diferencia de los estudios previos, presenta una mayor expresión en el tumor primario, lo cual es más coherente con su papel en el desarrollo de metástasis a distancia. Por todo ello, CXCR4 podría convertirse en una nueva diana terapéutica. De esta forma, la identificación de una molécula que inhiba la unión de CXCR4 con su ligando CCL20 podría prevenir el desarrollo de metástasis hepáticas.

CCR6. Estudios previos han demostrado que existe una fuerte asociación entre la intensidad de la expresión de CCR6 y la presencia de metástasis hepáticas síncronas, sugiriéndose que CCR6 juega un papel importante en el desarrollo de metástasis a distancia en el CCR (Ghadjar et al. 1910-16). A diferencia de la expresión de CXCR4, en nuestro estudio no se han podido demostrar diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de CCR6 en primarios y en

metástasis (diferencia de medias= -0.4896, $p=0.301$). El grado de correlación de ambos tampoco fue ES ($r_s=0.012$, $p=0.949$).

11.3 Marcadores angiogénicos

VEGF La angiogénesis tumoral es un paso fundamental en el crecimiento y progresión de los tumores sólidos y también en el desarrollo de la cascada metastásica (Folkman et al. 58-61). VEGF está asociado con la progresión tumoral a través de varios mecanismos: angiogénesis tumoral, transformación maligna y capacidad invasiva, migración de células tumorales... (Bruns et al. 488-99; Baek et al. 4621-31; Herold-Mende et al. 1573-82). Encontramos varios estudios sobre su valor pronóstico. Se ha demostrado que una alta expresión de VEGF en los tumores primarios constituye un marcador de mal pronóstico y está relacionado con el desarrollo de metástasis a distancia (Kim et al. 62-66) (Tokunaga et al. 998-1002). Se piensa que la razón de esto se encuentra en la creación de una extensa red de vascularización desde vasos preexistentes, lo cual constituye uno de los principales pasos en la formación de metástasis a distancia (Kondo et al. 622-30). Por ello, existe una fuerte evidencia que apoya el papel terapéutico de los fármacos antiangiogénicos. Entre ellos, los antagonistas VEGF son fármacos activos para el tratamiento de la enfermedad metastásica (Randal 520-22). El anticuerpo anti-VEGF humanizado bevacizumab está aprobado para el tratamiento en primera línea de CCR desde el 2004. Por ello, consideramos que medir el grado de expresión de VEGF podría ser un parámetro importante para predecir la eficacia de los tratamientos dirigidos frente al VEGF.

Su papel pronóstico tras la resección de metástasis a distancia también ha sido ampliamente estudiado. Noike y colaboradores demostraron que la supervivencia era mayor en los pacientes que no mostraban sobreexpresión de VEGF en las metástasis hepáticas resecadas (Noike et al. 201-08). Chen y colaboradores establecieron que los pacientes que no sobreexpresaban VEGF tenían una mejor supervivencia respecto a los pacientes que sí la sobreexpresaban en el análisis univariante, aunque no se pudo demostrar su valor pronóstico independiente en el análisis multivariante (Chen et al. 1555-63). En el caso de metástasis pulmonares Tamura y colaboradores obtuvieron resultados similares: la supervivencia a los 5 años de los pacientes con expresión negativa de VEGF en la lesión metastática era de 46.1% frente al 18% de los pacientes con una sobreexpresión. Se planteaba incluso la posibilidad de evitar la cirugía pulmonar en aquellos tumores que sobreexpresen VEGF debido su mal pronóstico (Tamura et al. 517-22).

En relación a la diferencia de expresión génica, en nuestro estudio no hay diferencias estadísticamente significativas de expresión entre el primario y la metástasis a distancia ($p=0.152$), lo cual es consistente con estudios previos de la literatura (Mooteri et al. 1073-80) (Chen et al. 1555-63). En nuestro trabajo, además, el coeficiente de correlación fue estadísticamente significativo ($r_s=0.453$, $p=0.009$), con lo cual podríamos afirmar que la expresión en el primario y en la metástasis tiende a ser parecida. Esta asociación entre la expresión de VEGF entre el primario y la enfermedad a distancia podría apoyar la hipótesis de la existencia de una subpoblación de células con especial potencial metastásico en los tumores primarios. Por ello, la determinación de VEGF en estas muestras podría reflejar la

potencial actividad metastásica del tumor (Chen et al. 1555-63). Por otro lado, gracias a este grado de correlación entre ambas determinaciones podríamos afirmar que la determinación de VEGF en el primario es una forma fiable de conocer con exactitud la expresión génica en la metástasis. La determinación del nivel de expresión de VEGF también podría ser un parámetro importante para predecir la eficacia de los fármacos dirigidos frente al VEGF, aunque su papel como factor predictivo de respuesta al tratamiento con anti-angiogénicos está aún por determinar.

Trombospondina (TSP). Maeda y colaboradores determinaron los niveles de una de las isoformas de la trombospondina, la TSP-1, en los primarios de colon (Maeda et al. 763-66). Aquellos que la sobreexpresaban presentaban un menor número de microvasos y una tasa de recurrencias de la enfermedad inferior a los que no la expresaban, lo que se traducía en un aumento de la supervivencia. Esta capacidad de la TSP-1 para disminuir la vascularización tumoral hizo que se estableciera su papel como inhibidor de la angiogénesis. En ese mismo estudio, se observó su valor pronóstico tras la resección de los primarios de colon: los pacientes con niveles elevados de TSP-1 presentaban una supervivencia del 91% frente al 44% en los pacientes cuyos tumores no sobreexpresaban TSP-1.

Sutton y colaboradores (Sutton et al. 6567-73) determinaron los niveles de TSP-1 en las metástasis hepáticas. Sus resultados son opuestos a los de Maeda: la expresión de TSP-1 en metástasis de adenocarcinoma de colon presenta un papel pronóstico negativo. La justificación para esta discrepancia en ambas determinaciones la encontramos en causas histológicas: la expresión de TSP-1 en los tumores primarios

se sobreexpresa en el citoplasma y en la membrana de las células tumorales, mientras que en la metástasis hepática suele expresarse en el estroma y en los vasos sanguíneos. Por ello, podría tener un papel antiangiogénico en el tumor primario y proangiogénico e invasivo en la metástasis hepática.

En nuestro trabajo obtuvimos una diferencia de expresión génica estadísticamente significativa, a favor de una mayor sobreexpresión en la metástasis hepática (diferencia de medias=0.57568, $p=0.007$). Además, el coeficiente de correlación entre ambos también fue significativo ($r_s=0.547$, $p=0.001$). Este grado de correlación nos indica que las variaciones de expresión del VEGF en la tumoración primaria (aumentos o disminuciones) se reproducen de una forma similar en la metástasis hepática, si bien los niveles de expresión no son iguales.

La diferencia de expresión (representada por la diferencia de medias) podría justificar el doble comportamiento anti y proangiogénico de la molécula propuesto en la literatura. 20 de nuestros pacientes presentaban metástasis sincronas, si bien 12 desarrollaron la enfermedad de manera metacrona. La menor sobreexpresión de la TSP-1 en los primarios y, por consiguiente, su inferior papel antiangiogénico puede ser la causa del desarrollo de la enfermedad hepática. Una vez se produce la metástasis hepática, su hipervascularización puede ser el factor determinante para incrementar la síntesis de TSP, lo cual mediante un feed-back positivo puede aumentar el potencial angiogénico de dicha molécula. El grado de correlación entre ambos podría ser un reflejo de la interacción entre las células tumorales y las metastásicas.

En conclusión, nuestros resultados justifican la actividad antiangiogénica de la TSP-1 en los tumores primarios, si bien en los depósitos metastáticos la TSP-1 podría comportarse como un factor proangiogénico o promoviendo la invasión celular, como se ha demostrado previamente con experimentos in vitro (Sargiannidou, Zhou, and Tuszynski 726-33). Por otro lado, en modelos animales se ha demostrado que la ausencia de TSP-1 se traduce en un incremento de la unión de VEGF con su receptor (Rodriguez-Manzaneque et al. 12485-90).

11.4 Oncogenes/Genes supresores de tumores

Smad4. Smad4 es un importante gen supresor de tumores que forma parte de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Se localiza en el cromosoma 18q21, una región con importantes cambios genéticos en los tumores de origen colorrectal.

En relación con la pérdida de expresión de Smad4, en tumores de páncreas se ha observado que esta suele ocurrir durante la tumorigénesis en estadios avanzados de la enfermedad (Wilentz et al. 2002-06). En cambio, en tumores de origen colorrectal se ha sugerido que la pérdida de su función ocurre en un estadio intermedio (antes de la aneuploidia pero posteriormente a que se produzca la inestabilidad de los microsatélites/inestabilidad cromosomal) (Woodford-Richens et al. 9719-23).

Estudios de cáncer colorrectal en varios estadios de la enfermedad, incluyendo metástasis en el hígado, han demostrado que las mutaciones de Smad4 suelen producirse en estadios tardíos de la carcinogénesis y su frecuencia se incrementa

con el desarrollo de metástasis (Miyaki et al. 3098-103). Cuando analizaron la presencia de mutaciones de Smad4 en algunos tumores primarios y en sus correspondientes metástasis hepáticas se observaron exactamente las mismas mutaciones. Se sugirió por lo tanto que la mutación se desarrolla en una de las células del tumor primario que luego es capaz de metastatizar a distancia, confiriéndole un valor como factor pronóstico.

Los resultados de nuestro estudio confirman que no existe diferencia entre la expresión de Smad4 en el tumor primario y en la metástasis a distancia ($p=0.224$), presentando además un grado de correlación estadísticamente significativo ($r=0.447$, $p=0.010$), por lo que podríamos afirmar que el nivel de expresión de ambos tiende a ser parecido. Estos resultados apoyarían por lo tanto la hipótesis de que modificaciones en su expresión (como ocurre con el desarrollo de mutaciones) ocurrirían en estadios precoces de la enfermedad, antes de que se produzca el desarrollo de las metástasis a distancia.

En relación con el papel pronóstico del Smad4 estudios recientes han identificado al Smad4 como un factor pronóstico de supervivencia en estadios C de Dukes. Alazouzzi y colaboradores determinaron los niveles de Smad4 en 86 muestras tumorales y demostraron que los pacientes con niveles altos de Smad4 tenían una mayor supervivencia global ($p<0.025$) y supervivencia libre de enfermedad ($p<0.013$) que los pacientes con niveles bajos (Alazzouzi et al. 2606-11). En nuestro trabajo, por el contrario, la expresión de SMAD4 en el tumor primario se ha relacionado con una mayor recaída tras la resección de metástasis hepáticas (coeficiente de regresión 0.261, $p=0.003$) y su expresión en la metástasis con un

aumento del riesgo de éxitus (coeficiente de regresión 0.159, $p=0.086$) tras la metastasectomía. Estos resultados, que difieren de los de la literatura, nos permiten hacer algunas consideraciones clínicas. Se podría sugerir que los pacientes con metástasis hepáticas que presentan una alta expresión del gen sometidos a una intervención quirúrgica deberían recibir un tratamiento adyuvante tras la cirugía, debido al mal pronóstico que les confiere esta expresión de Smad4. A este respecto, Smad4 ha demostrado también ser un factor predictivo de respuesta al tratamiento con 5 fluorouracilo en adyuvancia: Boulay y colaboradores observaron que entre los pacientes que recibían tratamiento con 5 fluorouracilo los que tenían copias normales de Smad4 tenían un beneficio tres veces mayor que aquellos con deleciones en Smad4 (Boulay et al. 630-34). Así pues, la determinación de los niveles de expresión en el tumor primario de Smad4 y puesto que el grado de correlación con su metástasis a distancia es estadísticamente significativo, puede ser de gran ayuda para determinar la posibilidad de respuesta de la enfermedad hepática a quimioterapia basada en fluorouracilo.

11.5 Moléculas de adhesión

El proceso de pérdida de las adhesiones intercelulares y de las células con la matriz extracelular suele relacionarse con la invasión de las células tumorales en los tejidos circundantes y en los vasos sanguíneos produciendo así una diseminación tumoral (Rudmik and Magliocco 347-59). En nuestro trabajo analizamos varias moléculas implicadas en este proceso.

Metaloproteinasa 9. La metaloproteinasa 9 (MMP-9) se encuentra sobreexpresada en los macrófagos de numerosos tipos de tumores, entre ellos, en las células de

origen colorrectal. En estas células se expresa en una subpoblación de macrófagos situada en el borde tumoral (los encargados de sintetizar la MMP-9). Esta enzima es una proteasa capaz de degradar las membranas basales, por lo que suele estar implicada en los pasos iniciales de la invasión tumoral (Liotta et al. 67-68).

Los trabajos que han estudiado los perfiles de expresión en los primarios y en sus correspondientes metástasis hablan de patrones de expresión diferentes. Illemann y colaboradores demostraron que el ARNm de la MMP-9 en los tumores primarios se sobreexpresa en los macrófagos localizados en el borde del tejido tumoral. Por el contrario, en las metástasis hepáticas, los macrófagos que lo sobreexpresan se encuentran dentro del parénquima, en las zonas centrales (bien cerca de áreas glandulares o en el área periportal), muy lejos del borde tumoral. Esto sugiere que no están implicadas directamente en el proceso de invasión tumoral a nivel de las metástasis a distancia, sino en el de asentamiento sobre el tejido huésped (Illemann et al. 293-302). Por el contrario, otros trabajos como el de Zeng y colaboradores muestran que la expresión de MMP-9 se sobreexpresa fundamentalmente en el borde situado entre la metástasis y el parénquima hepático sano. Por este motivo, se sugiere que los macrófagos juegan un papel importante para degradar la matriz extracelular de las metástasis hepáticas y en la invasividad local (Zeng and Guillem 575-82). Los resultados de nuestro trabajo muestran una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de las metaloproteinasas, siendo mayor su expresión en las metástasis hepáticas (diferencia de medias 0.7097, $p=0.048$). El grado de correlación presentaba una cierta tendencia estadística, ($r_s= 0.309$, $p=0.085$), lo que indica que

las variaciones de expresión se producen de una manera más o menos similar en el primario y en la metástasis. En nuestro trabajo se seleccionaron las muestras que presentaban al menos un 90% de células tumorales. Es decir, se seleccionaba la zona central del tumor (más rica en células tumorales) para evitar contaminaciones con el tejido sano adyacente. Consideramos que la diferencia de expresión se debe a la localización de los macrófagos (y por lo tanto, la MMP-9) en la muestra tumoral: central en el tejido hepático y periférica en el primario. Por lo tanto, la mayor expresión observada de MMP-9 en el parénquima hepático apoya la hipótesis planteada por Illemann, donde la expresión de MMP-9 en los tumores primarios se localiza en la periferia del tumor para aumentar su potencial invasor. Otros trabajos han demostrado que existe un aumento de la expresión de MMP-9 en tumores de colon indiferenciados o con mayor invasión local (tumores con peor pronóstico) y en aquellos con metástasis a distancia (Delektorskaya et al. 455-58). Por lo tanto, nuestros hallazgos apoyan el papel pronóstico de la metaloproteinasa 9 y su papel en el desarrollo de metástasis a distancia.

Urokinasa A. El sistema de activación del plasminógeno juega un papel importante en la invasión tumoral y en el desarrollo de metástasis a distancia junto con las metaloproteasas. El plasminógeno se activa gracias a una serie de moléculas para después producir plasmina, que degrada las proteínas de la matriz celular directamente o bien a través de las metaloproteasas (Liotta, Steeg, and Stetler-Stevenson 327-36). Entre estos activadores del plasminógeno la urokinasa tipo AP (uPA) se encuentra presente en los tumores en alta cantidad y juega un papel importante en la invasión tumoral (Pollanen, Stephens, and Vaheri 273-328).

En los tumores de origen colorrectal tanto uPA como su receptor uPAR han demostrado tener un papel pronóstico. Así, altos niveles de uPAR se relacionan con invasión ganglionar, infiltración perineural, desarrollo de metástasis hepáticas y con una menor supervivencia global (Abe et al. 2602-11).

Del mismo modo que con las metaloproteasas, los estudios acerca de la expresión en primarios y en metástasis hepáticas se centran en los distintos patrones de expresión histológica y no en la mayor o menor expresión de los mismos. Illerman y colaboradores determinaron la expresión de ARNm de uPA (y también mediante inmunohistoquímica de uPAR y de PAI) en 14 tumores primarios de origen colorrectal y en sus correspondientes metástasis hepáticas (Illemann et al. 1860-70). En los primarios se detectaron altos niveles de uPA en el denominado frente invasivo, es decir, en la región estromal entre el tejido tumoral y el tejido sano. En las metástasis hepáticas, el patrón de expresión era doble: en los 14 tejidos se detectó ARNm en la zona central del parénquima hepático, donde hay abundancia de macrófagos y necrosis central. No obstante, en 5 muestras también se detectaron altos niveles de uPA en la periferia del tumor, donde hay abundantes fibroblastos. Los resultados de nuestro trabajo aportan datos adicionales a este estudio: Nosotros no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión entre la metástasis y el tumor primario (0.259) y tampoco lo fue el grado de correlación entre ambos ($p=0.691$). Por ello consideramos que los niveles de expresión de uPA en las metástasis hepáticas son diferentes en distintas muestras, lo que está condicionado por los diferentes perfiles de crecimiento que puede mostrar. El conocimiento de la formación y crecimiento de metástasis en el

hígado adquiere una gran importancia terapéutica: si las metástasis hepáticas crecen de forma infiltrante, la actividad de las proteasas de la matriz (uroquinas, metaloproteasas) no sería necesaria para el proceso infiltrativo puesto que las células tumorales invadirían la cavidad sinusoidal. Por el contrario, en aquellas metástasis que presenten un patrón de crecimiento desmoplásico, la rotura de la matriz extracelular es fundamental para el proceso invasivo. En los pacientes que presenten este tipo de crecimiento se podría contemplar el desarrollo de dianas terapéuticas frente a estas proteasas para frenar el avance tumoral.

Cadherina Epitelial (E-cadherina). El dominio intracelular de e-cadherina se encuentra formando un complejo con otras proteínas citosólicas submembrana como la alfa-catenina y la beta-catenina. Estas cateninas median, a su vez, la conexión de la e-cadherina a los filamentos de actina (Mège, RM. et al. 541-548). Existe cierta evidencia de que una alteración de la expresión del complejo beta-catenina/e-cadherina se ha relacionado con desdiferenciación, invasión tumoral y desarrollo de metástasis a distancia. Una disminución de su expresión se relaciona con un peor pronóstico y con el desarrollo de metástasis hepáticas (Choi et al. 57-63). Por el contrario, una vez se han desarrollado las metástasis hepáticas, los pacientes con un aumento en la expresión de estas moléculas son los que presentan un peor pronóstico (Ikeguchi, Makino, and Kaibara 201-07). Bongiorono y colaboradores estudiaron estas moléculas en tumores de esófago y pulmón estableciendo la hipótesis de que las células tumorales pierden la E-cadherina de forma transitoria para metastatizar, y posteriormente la e-cadherina se reexpresa en las metástasis a distancia (Bongiorno et al. 166-72). Por todo esto, un aumento

de la expresión de las moléculas de adhesión en las células tumorales tras la diseminación a distancia desde el tumor primario puede ser importante para que las células tumorales se adhieran en los distintos órganos. En la literatura encontramos pocos trabajos que comparen el perfil de expresión de la e-cadherina en el tumor primario y en la metástasis a distancia. Según lo comentado anteriormente, sería coherente encontrar una disminución de su expresión en los tumores primarios a favor de un aumento de la misma en las metástasis a distancia. En nuestro trabajo sin embargo no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.497$) y el grado de correlación tampoco fue significativo ($p=0.733$). En el trabajo de Choi (Choi, H.N. et al, 57-63) se analizaron mediante inmunohistoquímica la e-cadherina de 42 primarios y metástasis hepáticas: en 27 la expresión era mayor en los primarios, en 12 mayor en las metástasis hepáticas y en 3 era similar. Las diferencias encontradas con nuestro trabajo pueden deberse a la diferencia en las técnicas de determinación génica (PCR versus inmunohistoquímica). No obstante, debido al bajo número de nuestra muestra no podemos dar una explicación precisa y el papel del complejo beta-catenina/e-cadherina en la enfermedad metastásica debería ser investigado en mayor profundidad.

11.6 Marcadores de apoptosis

Fas. El receptor de Fas (FasR, también denominado Apo-1 o CD95) se encuentra en la superficie de algunas células. Cuando se une su ligando (FasL) se inicia una cascada de señalización que conduce finalmente a la apoptosis celular.

En la literatura encontramos varios trabajos acerca del papel pronóstico de estos marcadores con resultados muy dispares. En el trabajo de Sheehan y colaboradores la expresión de FasL era mayor en estadios iniciales de Dukes y se relacionaba de forma inversa con la infiltración perineural y con la histología mucinosa (Sheehan et al. 375-80). Por el contrario, Nozoe y colaboradores determinaron mediante inmunohistoquímica la expresión de FasL en 143 pacientes, demostrando que la expresión de FasL se relacionaba con mayor afectación ganglionar y hepática (Nozoe et al. 83-88).

El desarrollo de metástasis hepáticas produce una activación del sistema inmunológico del paciente (objetivada en los denominados TIL -tumor infiltrating lymphocytes- localizados en el margen tumoral que impiden el avance de las células neoplásicas) (Yoong and Adams M256-M267). Simultáneamente, las células tumorales desarrollan un mecanismo específico para evadir esta agresión. Una de estas estrategias consiste en la disminución en la expresión de Fas y el aumento de la producción de FasL. Por un lado, la disminución de la expresión de Fas impide que se active la vía apoptótica en las células tumorales. Por otra parte, la sobreexpresión de FasL hace que éste pueda unirse al receptor Fas de los linfocitos localizados en el margen tumoral induciendo su apoptosis (evadiendo así el sistema inmunológico) y al receptor Fas de los hepatocitos, favoreciéndose la invasión local hepática de las células tumorales (Yoong et al. 693-703). Por este motivo, se podría esperar que las metástasis hepáticas mostraran un aumento de expresión de FasL y una disminución de Fas respecto a los tumores primarios. Se ha demostrado que la expresión del receptor de Fas es elevada en la mucosa colónica normal y casi

siempre negativa en las metástasis hepáticas (Moller et al. 371-77). Kikalos y colaboradores determinaron mediante inmunohistoquímica la expresión de Fas/FasL en 68 pacientes (Kykalos et al.). Encontraron una alta expresión de FasL en las metástasis hepáticas ($p=0.024$), mientras que la expresión de Fas estaba disminuida comparada con los estadios iniciales de la enfermedad ($p=0.016$). Esto podría suponer una ventaja inmunológica para las células tumorales constituyendo un mecanismo para evadir la acción citotóxica de los linfocitos T que expresan FasL, lo cual les confiere una resistencia frente a la apoptosis y una mayor agresividad tumoral.

Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos resultados opuestos: existía una tendencia hacia una mayor expresión de Fas en la metástasis hepática respecto al tumor primario, si bien no alcanzaba la significación estadística ($p=0.082$). Hallazgos similares los encontramos en el trabajo de Backus y colaboradores (aunque su determinación fue mediante inmunohistoquímica) (Backus et al. 206-11).

La explicación de este aumento de expresión la encontramos en la administración de quimioterapia basada en fluorouracilo (en nuestro trabajo 22 de los 32 pacientes recibieron adyuvancia basada en 5-FU). Como se comentó previamente este fármaco ejerce su acción a través de la TS, pero también juega un papel en la expresión del ciclo celular y en las proteínas relacionadas con la apoptosis, entre ellas el receptor de Fas. Por ello, la mayor expresión del receptor en las metástasis frente a la tumoración primaria puede ser secundaria a la acción citotóxica del 5FU

(constituiría un indicador de la apoptosis mediada por el 5 FU) (Backus et al. 209-16).

Por lo tanto, nuestros resultados apoyan el hallazgo de que el 5FU ejerce una acción directa sobre el ciclo celular y produce un incremento en la expresión del receptor Fas. Este aumento de expresión activaría la vía de señalización de las caspasas produciendo finalmente la apoptosis celular.

Bax. Bax juega un papel fundamental en la regulación de la muerte celular programada. Ejerce su efecto proapoptótico en la membrana mitocondrial. Por ello, los tumores que no sobreexpresan Bax son menos susceptibles a la apoptosis adquiriendo así una ventaja de crecimiento.

El papel pronóstico de Bax se ha estudiado tanto en los tumores primarios como en las metástasis hepáticas. En los adenocarcinomas de colon estadios III los tumores con una alta expresión de Bax están asociados con un mejor pronóstico que aquellos con una baja expresión ($p=0.009$) (Schelwies et al. 589-96). En la enfermedad metastásica se han encontrado resultados similares: en el trabajo de Sturm y colaboradores los pacientes con alta expresión de Bax tenían una supervivencia media de 53.6 meses tras la resección de las metástasis hepáticas comparada con 35.4 meses en los pacientes con una baja expresión (Sturm et al. 1364-74).

Bax adquiere además un valor predictivo de respuesta al tratamiento con fluorouracilo, puesto que esta molécula forma parte del proceso de inducción de la apoptosis mediada por 5 FU. Así, tras la administración de este fármaco se produce

un aumento en los niveles de Bax como consecuencia de la acción citotóxica ejercida por el fluorouracilo. Este aumento de Bax secundario a la administración de 5FU se ha relacionado con un mejor pronóstico (Nehls et al. 655-63; Nehls et al. 85-91).

Encontramos pocos estudios que comparen la expresión de Bax entre los tumores primarios y las metástasis. Uno de ellos, el de Backus y colaboradores, no consiguió hallar diferencias significativas de expresión (Backus et al. 206-11). Los resultados de nuestro trabajo coinciden con estos hallazgos, si bien muestran una cierta tendencia hacia un aumento de expresión de Bax en las metástasis hepáticas (diferencia de medias 0.54949, $p=0.061$). De manera similar a lo que ocurría con el aumento en la expresión de Fas, consideramos que esta mayor expresión de Bax en las metástasis hepáticas es secundaria a la administración de fluorouracilo adyuvante. Nuestros resultados por lo tanto corroboran los estudios previos que demuestran el papel fundamental que ejerce este fármaco en la cascada apoptótica.

11.7 Telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína que es capaz de sintetizar una de las cadenas del ADN telomérico, dando a los tumores una capacidad para una proliferación ilimitada. Esta enzima se encuentra en un 80-90% de los tumores humanos (Shay and Bacchetti 787-91). La activación de la telomerasa ocurre durante la carcinogénesis colorrectal y se correlaciona con la adquisición de malignidad desde el pólipo adenomatoso hasta el desarrollo de un cáncer invasivo (Kanamaru et al. 205-10). Los tumores primarios con alta actividad de la

telomerasa presentan mayor afectación ganglionar (Okayasu et al. 444-49), invasión venosa y una mayor incidencia de metástasis hepáticas (Shoji et al. 1304-09). En la enfermedad metastásica una alta expresión de hTERT se ha relacionado con una menor supervivencia tras la resección de metástasis hepáticas. Domont y colaboradores demostraron una supervivencia de 23 meses en pacientes con hTERT positiva en las metástasis colorrectales frente a 46 meses en aquellos que presentaban hTERT negativa ($p < .0001$) (Domont et al. 3086-93). Hasta la fecha no hay en la literatura estudios que comparen la expresión de hTERT en el tumor primario y en la metástasis hepática. Puesto que el aumento de expresión de hTERT está relacionado con una mayor invasividad y agresividad, se podría plantear la hipótesis de que en la enfermedad metastásica el nivel de expresión sea mayor. Sin embargo, en nuestro trabajo no encontramos diferencias de expresión estadísticamente significativas entre ambas muestras ($p=0.578$) y tampoco lo fue la correlación ($p=0.550$). Pensamos que estos resultados pueden estar sesgados por la posible desnaturalización de hTERT en el tejido hepático debido tanto a la abundante cantidad de enzimas proteolíticas como al período de isquemia producido durante la cirugía hepática. En cualquier caso, debido a su papel en la carcinogénesis, la consideramos una molécula potencial para el desarrollo de dianas terapéuticas (Chadeneau et al. 2533-36).

11.8 Moléculas de la vía EGFR

Los fármacos anti-EGFR constituyen una terapia fundamental en el tratamiento del CCR metastático. Estudios actuales sugieren la importancia del estado mutacional no sólo de KRAS (sólo un 20% de pacientes con KRAS wild type responden a los

antiEGFR cuando éstos se emplean en monoterapia) (Lievre et al. 3992-95; Amado et al. 1626-34; Karapetis et al. 1757-65), sino también del resto de mediadores de la vía de EGFR (BRAF, PIK3CA y la pérdida de PTEN (Di Nicolantonio et al. 5705-12; Laurent-Puig et al. 5924-30; Sartore-Bianchi et al. 1851-57; Perrone et al. 84-90; Bardelli and Siena 1254-61). En nuestro estudio realizamos el análisis mutacional de KRAS en 100 pacientes. Además, en los 60 pacientes con K-Ras no mutado se investigaron los principales genes implicados en la vía EGFR. En estas moléculas no se ha demostrado que el nivel de expresión (mayor o menor) tenga alguna significación predictiva. En cambio, el estado mutacional de las mismas adquiere especial relevancia. De hecho, los denominados tumores cuádruple negativos para alteraciones en KRAS, BRAF, PIK3CA y PTEN tienen una mayor tasa de respuestas que los tumores que sólo presentan una alteración (51% frente a 4%, $p < 0.0001$) (Sartore-Bianchi et al. e7287). Sin embargo, se desconoce si el papel predictor de estos marcadores en la tumoración primaria se reproduce de forma fiable en la enfermedad metastásica, debido a una posible discordancia en la presencia de mutaciones en las dos muestras. Esta discordancia podría por lo tanto limitar el potencial papel predictivo de estas moléculas a la hora de seleccionar un fármaco para la enfermedad metastásica.

Existe una gran cantidad de estudios que demuestran la existencia de una concordancia casi completa de KRAS entre los tumores primarios y la enfermedad metastásica (Etienne-Grimaldi et al. 4830-35; Santini et al. 1270-75; Cejas et al. e8199; Molinari et al. 1087-94; Perrone et al. 84-90), pero hay muy pocos trabajos que hayan comparado el resto de las moléculas implicadas en la vía. En nuestro

trabajo encontramos una alta concordancia de KRAS, BRAF y PIK3CA (94%, 100 y 94%, respectivamente), hallazgos similares a estudios previos de la literatura (Etienne-Grimaldi et al. 4830-35;Santini et al. 1270-75;Cejas et al. e8199;Molinari et al. 1087-94;Perrone et al. 84-90). Por el contrario, encontramos una baja concordancia para la pérdida de expresión de PTEN (66%), pAKT (54%) y para la expresión de EGFR (61%).

Ni la expresión de EGFR, ni la de pAKT, han demostrado jugar un papel en la terapia con anti-EGFR (Personeni et al. 5869-76). La baja concordancia de EGFR entre la tumoración primaria y la metástasis en nuestro trabajo coincide con lo descrito previamente, con independencia de que su determinación se realice mediante FISH o por inmunohistoquímica (Scartozzi et al. 4772-78;Italiano et al. 649-54). Nosotros encontramos que un 30% de los tumores primarios que no presentaban sobreexpresión de EGFR sí la sobreexpresaban en la enfermedad metastásica. En esos casos la expresión de EGFR se localizaba en el borde invasivo, lo que sugiere que EGFR puede tener un papel en el proceso de invasión tumoral.

Por otro lado demostramos un alto grado de expresión de pAKT tanto en la tumoración primaria (63%) como en la enfermedad metastásica (72%). El grado de expresión de pAKT refleja la actividad de este marcador en la vía de EGFR. Por lo tanto, nuestros resultados muestran una mayor capacidad proliferativa en la enfermedad avanzada. El grado de concordancia fue muy bajo, sólo un 54%, incluso inferior a otros descritos en la literatura (Loupakis et al. 2622-29). Las diferencias en el grado de expresión y la baja concordancia reducen por lo tanto el valor de la

determinación de este marcador en el tumor primario como predictor de la terapia con anti-EGFR.

La ausencia de expresión de PTEN sí se ha relacionado con resistencia a la terapia con anti-EGFR (Laurent-Puig et al. 5924-30) (Linot, B et al. 149) (Sood, A, et al. 50). Nosotros encontramos un grado de concordancia alto (66%), hallazgos similares a estudios previos (Loupakis et al. 2622-29) (Molinari et al. 1087-94) (Sood, A, et al. 50). En las metástasis se objetivó un mayor porcentaje de ausencia de PTEN. Estos hallazgos podrían justificar la relación que se ha propuesto entre la pérdida de PTEN y la formación de metástasis (Sawai et al. 56)

En nuestro estudio se demostró que en la enfermedad metastásica existía un menor porcentaje de tumores cuádruple negativos en comparación con el tumor primario (46% frente a un 64%, $p=0.04$). Este resultado sugiere que es necesario obtener biopsias de la enfermedad a distancia, puesto que la determinación de estos marcadores sólo en la tumoración primaria podría suponer un infratratamiento de muchos pacientes que potencialmente podrían beneficiarse del tratamiento con anti-EGFRs.

La mayor cantidad de mutaciones de KRAS, BRAF y PiK3CA detectadas en la enfermedad metastásica en relación con la tumoración primaria, así como un mayor índice de ausencia de PTEN hallados en nuestro trabajo, podrían demostrar una mayor activación de la vía EGFR en la enfermedad metastásica. Además, existe una clara discordancia de las combinaciones de estos genes en el tumor primario y

en la metástasis a distancia, por lo que no recomendamos tomar una decisión terapéutica basada únicamente en los hallazgos de la biosia primaria.

11.9 Factores pronósticos tras resección hepática

El manejo de los pacientes tras la resección de metástasis hepáticas está lleno de controversia debido a la enorme heterogeneidad de esta población. Algunos se convertirán en largos supervivientes, mientras que otros experimentarán una recurrencia precoz (Weber, SM. Et al. 643-50). En la literatura se han encontrado diversos sistemas pronósticos basados fundamentalmente en factores clínico-patológicos. Existen unas amplias variaciones entre ellos en lo referente a la metodología empleada, a las variables seleccionadas y al tamaño de la muestra que se utilizó para su elaboración. Estas diferencias hacen que sea muy difícil establecer comparaciones entre los diferentes estudios y extrapolar los resultados. Así, mientras que algunos sistemas categorizan a los pacientes en grupos de riesgo (Robertson, DJ. et al. 752-9; Ueno, H. et al. 59-66; Lise, M. et al. 638-44) y establecen el pronóstico de cada grupo, otros asignan un punto a cada variable que ha demostrado tener un valor pronóstico independiente y calculan el score total de riesgo (Fong, Y. et al. 309-18; Iwatsuki, S. et al. 291-9). Por el contrario, Schindl y colaboradores construyeron un modelo de regresión a través de una ecuación matemática calculada en función de las variables significativas en su serie (Schindl, M. et al. 183-9). Todos ellos están de acuerdo en que las características clínicas del paciente, los factores relacionados con la tumoración primaria, la forma de presentarse la enfermedad metastásica y los hallazgos quirúrgicos influyen en la evolución de la enfermedad (Fong, Y. et al. 309-18). No obstante, no existe un

consenso acerca de las variables exactas que nos permitan formular un sistema pronóstico válido y universal. En los estudios publicados no se han establecido los criterios de selección de las variables empleadas. Además, hasta la fecha, ningún trabajo ha validado los resultados de los sistemas pronósticos publicados previamente. En lo único en lo que parece existir consenso entre los investigadores es en la hipótesis de que para mejorar la selección de los pacientes que más se van a beneficiar de una terapia adyuvante los sistemas pronósticos deben incorporar el mayor número de variables (Fong, Y. et al. 309-18).

En nuestro estudio se investigó el papel pronóstico de seis de los sistemas propuestos, pero ninguno de ellos resultó válido en nuestra serie. Tan sólo pudimos confirmar el valor pronóstico de alguna de las variables incluidas en esos sistemas.

Las discrepancias entre los resultados de nuestro estudio y los previos pueden deberse a varios factores: las diferencias clínicas en la muestra seleccionada de pacientes (el estudio de Robertson se hizo únicamente con pacientes <65 años) (Robertson et al), las diferencias del tamaño muestral (1568 pacientes en el estudio de Nordlinger, 3957 recogidos a través del registro nacional en el estudio de Robertson), en el período de seguimiento (en nuestra muestra el periodo de seguimiento fue de veinte años) y factores relacionados con la cirugía hepática (la selección de los pacientes aptos para una cirugía hepática así como la experiencia observada en nuestro trabajo, no sólo en las muestras de los pacientes sino también en su manejo en las distintas instituciones, hace que sus resultados sean difícilmente extrapolables y carezcan de utilidad en la práctica clínica habitual. Es razonable pensar que un mayor número de factores incorporados permita una

mejor estratificación del riesgo de estos pacientes tras la cirugía, puesto que aporta una mayor cantidad de información acerca de la agresividad de la enfermedad. Sin embargo, todos los factores propuestos hasta la fecha son clínico-patológicos, y carecen de la sensibilidad apropiada para individualizar el riesgo, puesto que pacientes con variables idénticas presentan una evolución muy dispar (Smith, DL. et al, 45-51). En nuestro trabajo, y a pesar de la reducida muestra, tanto la expresión de la TS como de SMAD4 en la metástasis hepática conservaron su valor pronóstico sobre la SLE en el análisis multivariante, a diferencia de los factores clínicos y patológicos cuyo papel pronóstico sólo pudo establecerse en el análisis univariante. Estudios previos han objetivado el valor pronóstico de algunos de ellos, como la ploidía tumoral determinada mediante el Ki-67 (Petrowsky, H. et al. 85-87), la telomerasa (Dômont, J. et al, 86-93) y algunos oncogenes o genes supresores de tumores (Belluco, C. et al, 2696-2701). Si bien nuestros resultados deben ser confirmados en series más largas de pacientes, ponen de manifiesto la necesidad de incorporar marcadores moleculares, que no estén sujetos a variabilidad intermuestral, para aumentar la utilidad y la universalidad de los sistemas pronósticos tradicionales. No obstante, la transcendencia clínica de nuestros resultados y su posible aplicación en la práctica diaria se ve condicionada por el coste y la dificultad técnica que conlleva la determinación de estos factores, método sólo disponible en algunos centros hospitalarios de referencia. Por ello consideramos que debería realizarse un esfuerzo para elaborar y validar, de forma multicéntrica, un sistema pronóstico universal que incorpore variables clínicas, patológicas y moleculares que orienten el manejo de los pacientes tras la resección

hepática. Los resultados de nuestro trabajo pueden servir de base para la elaboración de futuros sistemas pronósticos que nos permitan individualizar el tratamiento de estos pacientes.

CONCLUSIONES

12 CONCLUSIONES

1. Existen diferencias en la expresión génica de CXCR4, THBS1, GSTP1, ECGF1, DPD y MMP9 entre la tumoración primaria y su correspondiente metástasis hepática.
2. Para el resto de genes esta diferencia en la expresión génica no se pudo demostrar aunque sólo la expresión de SMAD4, ERCC1 y VEGFA presentaba una correlación significativa (expresión génica similar) entre el tumor primario y la metástasis.
3. El estudio de la vía EGFR mostró una alta concordancia para KRAS, BRAF y PIK3CA. El grado de concordancia determinado mediante inmunohistoquímica de EGFR, PTEN y pAKT fue bajo.
4. Aunque en muchos casos existe correlación entre la tumoración primaria y la metástasis, ésta no puede asumirse en todos los casos. En los genes con potencial valor predictivo de respuesta es fundamental analizar el grado de correlación entre el primario y la metástasis. La ausencia de concordancia puede explicar la presencia de resistencia al tratamiento.
5. Los sistemas pronósticos diseñados para predecir la supervivencia tras la resección de metástasis hepáticas muestran resultados dispares difícilmente extrapolables y en nuestra muestra no se ha podido demostrar su validez.
6. En nuestra serie la expresión de SMAD4 y TS demostraron ser un factor pronóstico negativo para supervivencia libre de enfermedad.

7. La incorporación a los sistemas pronósticos de marcadores moleculares como la expresión de SMAD4 y de TS puede ayudar a individualizar el tratamiento tras la resección de metástasis hepáticas.

RESUMEN

13 RESUMEN

Con la llegada de dianas terapéuticas como los inhibidores de EGFR o de VEGF, se intenta realizar un tratamiento individualizado basado en perfiles moleculares. Generalmente, el tratamiento de la enfermedad metastásica se elige en función del perfil génico determinado en la tumoración primaria (muchas veces por accesibilidad de la muestra, no siempre se biopsian las lesiones metastásicas), asumiendo que los primarios y las metástasis podrían mostrar perfiles genicos similares. Sin embargo, esto sólo se ha demostrado puntualmente para algunos genes como K-ras y B-raf. Por este motivo, y debido a las implicaciones terapéuticas que esto conlleva, decidimos estudiar el comportamiento de varios genes relacionados con el proceso de metastatización (CXCR4, CCR6, TSP1, VEGFA, e-cadherina, MMP9, urokinasa A, hTERT, FAS/APO95, BAX, SMAD4) y otros relacionados con la resistencia a fármacos (TS, TP, DPD, ERCC1, GST-PI, TOPO I, KRAS) en la tumoración primaria y en su correspondiente metástasis hepática.

Encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de CXCR4, THBS1, GSTP1, ECGF1, DPD y MMP9 entre la tumoración primaria y la metástasis a distancia. En el resto de genes donde no se pudo demostrar esta diferencia de expresión sólo encontramos una correlación génica significativa (es decir, una expresión génica similar) en las parejas de SMAD4, ERCC1 y VEGFA.

En relación con la vía EGFR se demostró un alto grado de correlación para KRAS, BRAF y PIK3CA. Por el contrario, la determinación mediante inmunohistoquímica de PTEN, EGFR y pAKT mostró un bajo grado de correlación. En el estudio de factores pronósticos realizado se incluyeros variables clínicas, patológicas y moleculares. En

el análisis multivariable ña TS y SMAD4 demostraron tener valor pronóstico para la SLE. Sin embargo, no se identificó ninguna variable con valor pronóstico oara la supervivencia global.

Finalmente, se intentaron validar en nuestra serie los principales sistemas pronósticos publicados en la literatura, sin embargo, ninguno de ellos resltó útil en nuestra población. Es posible que la incorporación de variables moleculares a esos sistemas pueda mejorar su capacidad predictiva.

A pesar de la reducida muestra, consideramos que nuestro trabajo revela la importancia de realizar el estudio del perfil génico en la lesión metastásica puesto que la información que proporciona es diferente a la obtenida en la tumoración primaria. Además, esto puede suponer diferencias en el manejo terapéutico y en el seguimiento de estos pacientes, diferencias que serán cada vez más notorias con la llegada de nuevas dianas moleculares en los próximos años.

CLAVES DE LAS ABREVIATURAS

14 CLAVES DE LAS ABREVIATURAS

5 FU: 5-Fluorouracilo.

ACP: Focos de Criptas Aberrantes.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ADNm: ADN mensajero.

APC: Adenomatosis Poliposis coli.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ATP: Adenosin Trifostato.

CAP: *College of American Pathologists* (Colegio de Patólogos Americanos)

CCR: Cáncer Colorrectal.

CEA: Antígeno Carcinoembrionario.

CIN: Inestabilidad Cromosómica.

Ct: Ciclo umbral.

DPD: Dihidropirimidín Deshidrogenasa.

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial.

ERCC1: Escision Repair Cross Complementing.

FAP: Poliposis Adenomatosa Familiar.

FOLFIRI: Esquema de Quimioterapia que incluye Irinotecán y 5-Fluorouracilo-Leucovorín.

FOLFOX: Esquema de Quimioterapia que incluye Oxaliplatino y 5-Fluorouracilo-Leucovorín.

FOLFOXIRI: Esquema de Quimioterapia que incluye Oxaliplatino, Irinotecán y 5-Fluorouracilo-Leucovorín.

GH: *Growth Hormone* (Hormona del Crecimiento)

GST-Pi: Glutation S Transferasa.

HAi: *Hepatic Arterial Infusion* (Infusión intraarterial -de quimioterapia-)

HNPCC: Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico.

HR: *Hazard Ratio*.

hTERT: *human Telomerase Reverse Transcriptase*.

IC: Intervalo de Confianza.

IGF I: *Insuline Growth Factor* (Factor de Crecimiento de la Insulina).

IOUS: *Intraoperative Ultrasonography* (Ecografía intraoperatoria)

LOH: Pérdida de Heterozigosidad.

LV: Leucovorín.

MMP 9: Metaloproteinasa 9.

MMR: *Mismatch Repair System*.

MSI: Inestabilidad de Microsatélites.

NER : *Nucleotide Excision Repair*.

OPRT : Orotato Fosforibosil Transferasa

PAI: Inhibidor de la Activación del Plasminógeno.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

qRT-PCR: *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*.

SG: Supervivencia Global.

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad.

SLP: Supervivencia Libre de Progresión.

TGFB: Factor de crecimiento transformante beta.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TP: Timidín Fosforilasa.

TS: Timidin Sintetasa.

TSP1: Trombospondina 1.

uPA: Activador de plasminógeno tipo urokinasa.

UP: Uridin Fosforilasa.

VEGF: Factor de Crecimiento derivado del Endotelio vascular.

XPD: Xeroderma Pigmentosum D.

XPF: Xeroderma Pigmentosum F.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

15 COMUNICACIÓN TIPO PÓSTER EN ASCO 2009



American Society of Clinical Oncology

www.asco.org

Concordance of K-Ras status between colorectal cancer (CRC) primaries and related metastatic samples considering clinicopathological features.

Sub-category:
Colorectal Cancer

Category:
Gastrointestinal (Colorectal) Cancer

Meeting:
2009 ASCO Annual Meeting

Session Type and Session Title:
General Poster Session, Gastrointestinal (Colorectal) Cancer

Abstract No:
4053

Citation:
J Clin Oncol 27:15s, 2009 (suppl; abstr 4053)

Author(s):
P. Cejas, M. López-Gómez, R. Madero, J. De Castro, E. Casado, C. Belda, J. Larrauri, J. Barriuso, M. González-Barón, J. Feiló; Hospital La Paz, Madrid, Spain; Hospital Infanta Sofía, San Sebastian de los Reyes, Madrid, Spain

Abstract Disclosures

Faculty and Discusant Disclosures

Annual Meeting Planning Committee Disclosures

2009 Annual Meeting Proceedings Part 1: Errata

Abstracts that were granted an exception in accordance with ASCO's Conflict of Interest Policy are designated with a caret symbol (*) here and in the printed Proceedings.

Abstract:

Background: K-Ras mutations in CRC primaries may predict resistance to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies, but we don't know its behaviour in metastatic tissue. The aims of this study were: 1) Evaluate the grade of concordance of K-Ras status between primary and related metastatic samples 2) Establish a correlation between K-Ras status and individual clinicopathological features **Methods:** K-ras mutations were retrospectively analysed in primary tumours of 124 patients and 138 related metastatic sites. The primary tumour site was colon in 87 patients and rectum in 37. Sites of metastases were liver (115 samples, 83.3%) and lung (23 samples, 16.7%). Some patients underwent surgery several times. We analyzed K-Ras point mutations in codons 12 and 13 by direct DNA sequencing from paraffin-embedded tumour and studied its relation with 13 clinicopathological features **Results:** K-Ras mutation was observed in 42(33.6%) primary tumours and in 52(39.1%) related metastatic sites, being the grade of concordance between primary and metastatic sites of 93% (95% CI: 97.5-88.3%). Discordance was observed in 9 (7%) patients: in 2, K-Ras status was wild type in metastatic site and expressed a mutational pattern in the primary tumour; vice versa, in 7, the mutation status was detected in the metastases meanwhile primary tumour was wild type. We also found statistically significative differences in mutation patterns regarding the site of the metastatic tissue: K-ras mutations were detected in 13 lung samples (61.9%) and in 39 liver samples (34.8%) ($p=0.026$). Of all the clinicopathological features analyzed we confirmed an increase of mutated K-ras status in tumours which had presented as perforation ($p=0.044$). No other relation with clinicopathological data was detected **Conclusions:** With this observational analysis, we confirm the high concordance (superior to 90%) between primary and related metastatic sites in terms of K-Ras status; for the first time, we have reported a higher mutational pattern in lung metastases than in liver disease, findings that may have important relevance regarding clinical/treatment decisions. For the realization of this study we received a grant from Amgen.

Associated Presentation(s):

1. Concordance of K-Ras status between colorectal cancer (CRC) primaries and related metastatic samples considering clinicopathological features.

Meeting: 2009 ASCO Annual Meeting

Presenter: Paloma Cejas

Session: Gastrointestinal (Colorectal) Cancer (General Poster Session)

16 COMUNICACIÓN TIPO PÓSTER EN ASCO 2010



American Society of Clinical Oncology

www.asco.org

Analysis of EGFR pathway mediators in KRAS wild-type primary tumors is not representative of their status in related metastases.

Sub-category:

Colorectal Cancer

Category:

Gastrointestinal (Colorectal) Cancer

Meeting:

2010 ASCO Annual Meeting

Session Type and Session Title:

General Poster Session, Gastrointestinal (Colorectal) Cancer

Abstract No:

3589

Citation:

J Clin Oncol 28:15s, 2010 (suppl; abstr 3589)

Author(s):

P. Cejas, M. Lopez-Gomez, C. Aguayo, R. Madero, J. De Castro, C. Belda-Iniesta, J. Barriuso, E. Burgos, M. Gonzalez-Baron, J. Felli; Translational Oncology Unit IIB/CSIC/HULa Paz, Madrid, Spain; Hospital Infanta Sofia, San Sebastian de los Reyes, Spain; Department of Medical Oncology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain; Biostatistics Unit, La Paz University Hospital, Madrid, Spain; Department of Pathology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

Abstract Disclosures

Faculty & Discussant Disclosures

Annual Meeting Planning Committee Disclosures

Abstracts that were granted an exception in accordance with ASCO's Conflict of Interest Policy are designated with a caret symbol (^) here and in the printed Proceedings.

Abstract:

Background: KRAS mutated CRC patients are nonresponsive to anti-EGFR. In contrast, the clinical benefit of KRAS wild type is uncertain and needs further studies. Our retrospective study compared the status of the most relevant EGFR pathway downstream regulators between primary tumors and related metastases of KRAS wild type patients. **Methods:** One hundred and seventeen pairs of primaries and metastases from patients diagnosed with CRC were tested for KRAS mutated status. Wild type KRAS pairs were further analyzed downstream for EGFR mediators and for EGFR itself. Pair concordance and impact of clinicopathological variables was analyzed. Patients were anti-EGFR therapy naïve. **Results:** The level of concordance in the presence of KRAS mutations was 92% between the primary tumor and the related metastases. KRAS wild type pairs were analyzed for BRAF and PI3KCA mutational status and for EGFR and pAKT expression and PTEN lost in patients pairs and levels of concordances were 100%, 94%, 61%, 53% and 73% respectively. Of the 61% KRAS wild type patients, only 18% showed complete concordance between the primary tumor and the related metastases for the rest of the five markers analyzed. Thus, 82% of KRAS wild type pairs showed a different EGFR pathway status between the primary tumor and the related metastasis. **Conclusions:** In this most extensive study to date of tumoral pairs, results show that for 82% of the KRAS wild type patients, the analysis of the primary tumor is not representative of the related metastases, suggesting the need for rebiopsy of the metastases to adjust the anti-EGFR therapy predictive value of some EGFR mediators.

Associated Presentation(s):

1. Analysis of EGFR pathway mediators in KRAS wild-type primary tumors is not representative of their status in related metastases.

Meeting: 2010 ASCO Annual Meeting

Presenter: Paloma Cejas

Session: Gastrointestinal (Colorectal) Cancer (General Poster Session)

18 COMUNICACIÓN ORAL SEOM 2011

El trabajo “COMPARACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE TUMORES DE ORIGEN COLORRECTAL Y SUS CORRESPONDIENTES METÁSTASIS HEPÁTICAS” ha sido aceptada por la SEOM para el encuentro bienal de 2011. Dicha comunicación se celebrará el 19 de Octubre de 2011 y se enmarcará en la SESIÓN DE COMUNICACIONES ORALES 2: COLORRECTAL de dicho evento con el número O-11.

19 PUBLICACIÓN EN REVISTA INTERNACIONAL

OPEN ACCESS Freely available online



KRAS Mutations in Primary Colorectal Cancer Tumors and Related Metastases: A Potential Role in Prediction of Lung Metastasis

Paloma Cejas¹, Miriam López-Gómez^{1,4}, Cristina Aguayo¹, Rosario Madero³, Javier de Castro Carpeño¹, Cristóbal Belda-Iniesta¹, Jorge Barriuso¹, Víctor Moreno García¹, Javier Larrauri³, Rocio López¹, Enrique Casado⁴, Manuel Gonzalez-Barón¹, Jaime Feliu^{1*}

¹ Department of Medical Oncology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain, ² Biostatistics Unit, La Paz University Hospital, Madrid, Spain, ³ Department of Pathology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain, ⁴ Department of Medical Oncology, Infanta Sofía Hospital, Madrid, Spain

Abstract

Background: KRAS mutations in colorectal cancer primary tumors predict resistance to anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) monoclonal antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer, and thus represent a true indicator of EGFR pathway activation status.

Methodology/Principal Findings: KRAS mutations were retrospectively studied using polymerase chain reactions and subsequent sequencing of codons 12 and 13 (exon 2) in 110 patients with metastatic colorectal tumors. These studies were performed using tissue samples from both the primary tumor and their related metastases (98 liver, 84%, 17 lung, 16%). All patients received adjuvant 5-Fluorouracil-based polychemotherapy after resection of metastases. None received anti-EGFR therapy. Mutations in KRAS were observed in 37 (34%) of primary tumors and in 40 (36%) of related metastases, yielding a 94% level of concordance (kappa index 0.86). Patients with primary tumors possessing KRAS mutations had a shorter disease-free survival period after metastasis resection (12.0 vs 18.0 months; $P=0.035$) than those who did not. A higher percentage of KRAS mutations was detected in primary tumors of patients with lung metastases than in patients with liver metastases (59% vs 32%; $p=0.054$). To further evaluate this finding we analyzed 120 additional patients with unresectable metastatic colorectal cancer who previously had their primary tumors evaluated for KRAS mutational status for clinical purposes. Separately, the analysis of these 120 patients showed a tendency towards a higher degree of KRAS mutations in primary tumors of patients with lung metastases, although it did not reach statistical significance. Taken together the group of 230 patients showed that KRAS was mutated significantly more often in the primary tumors of patients with lung metastases (57% vs 35%; $P=0.006$).

Conclusions/Significance: Our results suggest a role for KRAS mutations in the propensity of primary colorectal tumors to metastasize to the lung.

Citation: Cejas P, López-Gómez M, Aguayo C, Madero R, de Castro Carpeño J, et al. (2009) KRAS Mutations in Primary Colorectal Cancer Tumors and Related Metastases: A Potential Role in Prediction of Lung Metastasis. PLoS ONE 4(12): e6199. doi:10.1371/journal.pone.0006199

Editor: Albert Navarro, University of Barcelona, Spain

Received: September 1, 2009; **Published:** December 10, 2009

Copyright: © 2009 Cejas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work received grant support from Amgen, Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, RD06-0020-1022), Fundación Mutua Madrileña and from Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP), Madrid, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: jfeliu.hulp@hlpz.madrid.es

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies and one of the leading causes of cancer-related death in developed countries [1]. Distal metastasis is the main cause of death in CRC patients. Depending on the stage of the primary tumor, liver metastases occur in 20% to 70% of patients, and lung metastases in 10% to 30% of patients [2]. Surgical resection remains the only potentially curative option for patients with metastatic CRC. However, curative resection is possible in less than 25% of patients with stage IV disease [3], and less than 5% of patients with unresectable metastatic CRC are alive after 5 years. Major efforts are being made to improve the prognosis for patients with metastatic CRC, especially in the development of

new therapeutic strategies. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) signalling pathway has become a key target for therapeutic intervention because two monoclonal antibodies directed against EGFR have become important tools in the management of advanced disease: cetuximab and panitumumab [4,5]. EGFR activates proliferative and antiapoptotic signalling pathways, such as the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt and Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [6]. Aberrant activation of the EGFR pathway in CRC could be caused by either EGFR overexpression or mutational activation of downstream elements of the EGFR pathway [7].

KRAS is a small GTP-binding protein that transduces signals from activated cell surface receptors to the nucleus. Constitutive KRAS activation by point mutations in codons 12 and 13 of exon 2

has been described as an important cause of EGFR pathway overactivation [7,8]. The incidence of *KRAS* mutations in colorectal tumors ranges from 35% to 45% [9], and *KRAS* mutations seem to occur early in carcinogenesis [10]. Accordingly, a high degree of concordance in *KRAS* mutational status between primary tumors and their related liver metastases has been reported [11,12]. Recent data have demonstrated an association between *KRAS* mutational status in the primary tumor and resistance to cetuximab and panitumumab in patients with metastatic CRC [13,14]. However, the association between *KRAS* mutational status and prognosis is controversial for patients with metastatic CRC that have not been treated with anti-EGFR antibodies, with some studies reporting a link between *KRAS* mutations and poor prognosis [15] and some reporting no association [12]. Interestingly, the largest multicenter study conducted on the association between *KRAS* mutation and prognosis, which included 3439 CRC patients, showed that the presence of a glycine-to-valine mutation at codon 12 of *KRAS* significantly decreased progression-free and overall survival rates irrespective of the treatment received [16].

We sought to elucidate the correlation between *KRAS* mutational status, clinicopathologic factors, prognosis, metastasis pattern and concordance between the primary tumor and matched metastases in patients with metastatic CRC.

Results

Patient Characteristics

We retrospectively analyzed specimens from 110 primary tumors and 110 corresponding metastatic sites for the presence of *KRAS* mutations in codons 12 and 13. The most common metastatic site was the liver, which was the metastatic site in 93 samples (84%). The lung was the metastatic site in the remaining 17 samples (16%). Metastases appeared synchronously with the primary lesion in 57 cases and metachronously in 53 cases. The primary tumor site was the colon in 79 patients and the rectum in 31 patients. The patient group included 32 women and 78 men. Median age was 64 years (29–86). All cancers were adenocarcinomas and were graded according to WHO criteria (Table 1).

KRAS Mutations and Histopathological Parameters

Mutations in *KRAS* were detected in 37 (34%) primary tumors and in 40 (36%) related metastatic lesions, with a 94% grade of concordance between primary and metastatic samples (kappa index 0.86). Discordance was observed in 7 patients. Five patients had *KRAS* mutations in the metastases (four with liver metastases and one with lung metastases) and wild type *KRAS* in the primary tumor, whereas the two other patients had *KRAS* mutations only in the primary tumor (1 with liver metastases and 1 with lung metastases).

There was little variance between the mutation type present in the primary tumor and its metastases: all but four patients had the same mutation in both the primary and the metastatic samples. The types of mutations are summarized in Table 2. There was no relationship between the type of mutations and any clinicopathological parameter.

No associations between *KRAS* mutations and histopathological characteristics were observed (Table 3).

KRAS Mutations and Prognosis

Our results show lower rates of disease-free survival after metastasis resection in patients whose tumors had a *KRAS* point mutation in the primary tumor; median disease-free survival was 12 months in patients with *KRAS* mutations in their tumors and 18

Table 1. Patient characteristics.

Characteristic	Value
Total number of primary tumors	110
Total number of metastatic samples	110
Liver	93
Lung	17
Age, median (range)	64 (29–86 yr)
Gender (male/female)	78/32
Histological Grade	
1	2
2	90
3	10
Primary tumor site (colon/rectum)	79/31
Primary stage (WHO classification)	
I	3
II	20
III	38
IV	59
Adjuvant treatment schedule	
5-Fluorouracil/Leucovorin	36
Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin	46
Irinotecan/5-Fluorouracil/Leucovorin	28
Neoadjuvant treatment schedule	
Radiotherapy (45 Gy)/5-Fluorouracil/Leucovorin	8
Radiotherapy (45 Gy)/Irinotecan/Oxaliplatin	15
Radiotherapy (45 Gy)/Capecitabine/Oxaliplatin	8
Synchronous/Metachronous metastases	57/53

doi:10.1371/journal.pone.0000199.t001

months in those without *KRAS* mutations ($p=0.035$) (Figure 1). The multivariate analysis showed that the most significant independent predictor for disease-free survival was *KRAS* mutational status (multivariate HR = 2.068, 95% CI, 1.136–3.766, $P=0.018$) (Table 4). No association was found between overall survival and *KRAS* mutational status (Figure 1).

KRAS Mutations and Metastatic Site

Mutated *KRAS* was detected in a higher proportion of primary tumors of patients with lung metastases than in those with liver metastases (59% vs 32%, $P=0.034$). When stratified by origin of

Table 2. Codon distribution of specific *KRAS* mutations.

Mutations	Primary tumors	Liver metastases	Lung metastases
Gly12Asp	2	2	1
Gly12Asp	16	12	4
Gly12Cys	2	2	0
Gly12Ser	0	0	1
Gly12Val	11	9	2
Gly13Asp	6	5	2
Total	37	30	10

doi:10.1371/journal.pone.0000199.t002

Table 3. Relationship between *KRAS* mutational status and tumoral variables measured in primary tumors.

	Mutated <i>KRAS</i>		WT <i>KRAS</i>		P value
	N	%	N	%	
Gender					0.376
Male	24	31%	54	69%	
Female	13	41%	19	59%	
Age					1.000
>60	24	33%	40	67%	
<60	13	34%	25	66%	
Tumor location					0.025
Rectum	11	36%	20	69%	
Colon	26	33%	53	67%	
Obstruction					0.616
Yes	6	27%	16	73%	
No	31	35%	57	65%	
Perforation					0.176
Yes	4	67%	2	33%	
No	33	32%	71	68%	
Primary tumor stage					0.970
I	1	33%	2	67%	
II	6	30%	14	20%	
III	9	32%	19	68%	
IV	21	36%	38	66%	
Metastatic presentation					0.540
Synchronous	21	37%	36	63%	
Metachronous	16	30%	37	70%	
Lymphatic invasion					0.095
Yes	9	53%	8	47%	
No	20	30%	64	70%	
Venous invasion					0.616
Yes	6	27%	16	73%	
No	31	36%	56	66%	
Perineural invasion					0.760
Yes	5	39%	8	61%	
No	32	33%	64	67%	

doi:10.1371/journal.pone.0000199.t003

the primary tumor (colon or rectum), of the 10 *KRAS*-mutated primary tumors of patients with lung metastases, 7 were colonic in origin (70%) whereas the other 3 originated in the rectum (30%). Statistical analysis revealed that colonic primary tumors of patients with lung metastases were significantly more likely to have *KRAS* mutations than colonic primary tumors of patients with hepatic metastases ($P=0.046$), whereas rectal primaries had a similar frequency of *KRAS* mutations in patients with lung or liver metastases (Table 5). To further investigate the presence of *KRAS* mutations as a predictor of lung metastasis, we also examined a series of 120 patients with unresectable metastatic CRC. The primary tumors of these patients had been analyzed for the presence of *KRAS* mutations by a central laboratory prior to cetuximab administration. Of the 120 metastatic patients, 86 had liver metastases and 34 had lung metastases. In addition, there was a tendency towards a higher proportion of *KRAS* mutations in

primary tumors of patients with lung metastases than in those with liver metastases, although it did not reach statistical significance (56% vs 38%, $P=0.1037$). When we analyzed the whole series of 230 patients, the frequency of *KRAS* mutations in the primary tumors of patients with lung metastases was significantly higher as compared with liver metastases (57% vs 35%, $P=0.005$). When patients were stratified by primary tumor origin, only patients with colonic primary tumor origin showed a significantly higher frequency of *KRAS* mutations in primary tumors of patients with lung metastases as compared with those with liver metastases (59% vs 34%, $P=0.039$) (Table 6).

Discussion

The prognosis for patients with metastatic CRC has improved since the introduction of novel therapeutic agents such as anti-EGFR antibodies [17]. This therapeutic success highlights the importance of counteracting the EGFR pathway to control advanced disease. Alternate activation of the EGFR pathway sometimes occurs by mutational activation of *KRAS*. Recent clinical trials have shown that the presence of activating mutations in *KRAS* identifies patients who are non-responders to cetuximab [13] or panitumumab [14]. In fact, based on these results, mutational analysis of *KRAS* is now recommended by The US Food and Drug Administration (FDA) prior to cetuximab or panitumumab administration to patients with metastatic CRC. Mutational analysis of *KRAS* is commonly performed on the primary tumor because it is often the only available tissue. Moreover, the value of performing this analysis on the primary tumor is further supported by evidence that *KRAS* point mutations occur early in CRC carcinogenesis [10]. However, recent data have demonstrated an increased frequency of mutations in lymph node metastases as compared with their related primary tumors [18]. With this in mind, the potential need for rebiopsy and analysis of *KRAS* in the metastases has been suggested [9]. Other recent studies have reported a high degree of concordance in *KRAS* mutational status between primary tumors and their related liver metastases [11,12,19]. The results from our series of 110 patients are in complete agreement with these reports, both in the frequency of *KRAS* mutations in primary tumors, which was 34% in our study, and in the high degree of concordance between primary tumors and their related metastases. All of these findings confirm that analysis of *KRAS* mutational status in the primary tumor is an adequate surrogate marker of *KRAS* mutational status in metastases. Our study includes an analysis of both liver and lung metastases. As far as we know, this is the first study to analyze primary colorectal tumors and their related lung metastases and correlated *KRAS* mutational status based on both clinicopathological features and survival data. The liver and the lung are both common sites of CRC metastases. Secondary to their respective anatomical blood vessel distribution, lung metastases are more common with renal cancers and liver metastases are more frequent with colon cancers. However, some colon cancer patients experience lung metastases without evidence of previous liver metastases. This unexplained anatomical pattern of metastasis, observed with increasing frequency due to more accurate diagnoses based on highly efficient CT scans [20], suggests a peculiar biological mechanism of carcinogenesis or a special susceptibility of the lung parenchyma to tumors in these patients. Our results demonstrate a higher percentage of *KRAS* mutations in primary tumors of patients with lung metastases as compared with those with liver metastases (59% vs 32%). Moreover, when we stratified our results based on the primary tumor site, only tumors of colonic origin had a significantly higher frequency of *KRAS*

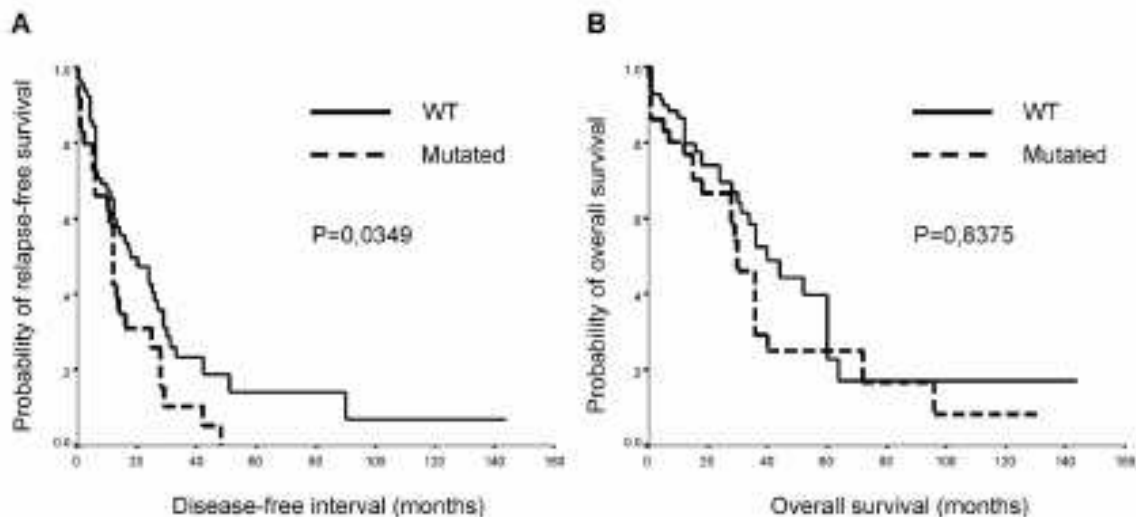


Figure 1. Kaplan-Meier survival analysis. Curves for disease-free survival (A) and overall survival (B) according to *KRAS* status.
doi:10.1371/journal.pone.0008199.g001

mutations in primary tumors of patients with lung metastases. By contrast, total primary tumors showed a similar frequency of *KRAS* mutations in patients with lung metastases than in those with liver metastases. To further analyze this finding we studied an independent series of primary tumors from patients with unresectable metastatic CRC and examined the relationship between *KRAS* mutational status in the primary tumor and the site of tumor metastasis. In these patients, *KRAS* mutational status in the primary tumor was previously analyzed for clinical purposes prior to cetuximab administration. Statistical analysis of the whole series (230 patients) revealed that *KRAS* is more frequently mutated in the primary tumors of patients with lung metastases compared with patients with liver metastases (57% vs. 35%, $P=0.006$). When the results are stratified according to the site of the primary tumor, the analysis we performed including all 230 patients confirmed the results we obtained with the smaller sample of 110 patients: that the significantly increased frequency of *KRAS* mutations in primary tumors in patients with lung metastases was restricted to those primary tumors that originated in the colon. This finding suggests that EGFR pathway activation may allow colonic tumor cells to grow preferentially in the lung parenchyma avoiding an initial step of liver metastasis. A previous study that evaluated *KRAS* status in primary colorectal tumors and non-matched liver and lung

metastases showed concordant results with our study and revealed a higher incidence of *KRAS* mutations in lung metastases than in liver metastases (57% vs. 50%) [21]. However, in that study, a major difference in *KRAS* activation between the primary and metastatic tumors could have been masked by the absence of related primary and metastatic samples. This finding has clinical importance because it may allow the identification of patients who are more likely to develop lung metastases based on *KRAS* analysis of the primary tumor. These patients should potentially receive a more thorough clinical workup, including a thorax scan, which is not always included in the standard clinical workup for CRC.

Our results also show that the presence of *KRAS* mutations is an independent prognostic factor in the prediction of disease-free survival (reaching statistical significance). Constitutive activation of the Ras-Raf-MAP-kinase pathway is known to confer proliferative and disseminative advantage to tumor cells. However, controversy exists regarding the prognostic role of *KRAS* mutations in CRC. The biggest clinical trial designed to analyze the prognostic value of *KRAS* status was the RASCAL study, which showed that a glycine-to-valine mutation in codon 12 increased the risk of recurrence and death by 30%, irrespective of the type of therapy administered [16]. However, a recent study performed

Table 4. Multivariate disease-free survival analysis.

	HR	95% CI	P
Primary tumor <i>KRAS</i> status	2.068	1.136–3.766	0.019
Primary tumor stage	1.165	0.968–1.363	0.310
Metastases site	0.999	0.899–1.109	0.981
Total number of metastases	1.018	0.876–1.184	0.813
Neoadjuvant treatment	1.457	0.770–2.755	0.247
Metastases site	0.582	0.274–1.237	0.159

Abbreviations: HR: Hazard Ratio; CI: Confidence Interval.
doi:10.1371/journal.pone.0008199.t004

Table 5. *KRAS* mutational status in the primary tumor according to the metastatic site (series of 110 patients).

Metastatic site	WT	Mutated	Total	P
<i>KRAS</i> (colon)				0.046
liver	47 (69%)	21 (31%)	68	
lung	4 (36%)	7 (64%)	11	
<i>KRAS</i> (rectum)				0.653
liver	16 (64%)	9 (36%)	25	
lung	3 (50%)	3 (50%)	6	

doi:10.1371/journal.pone.0008199.t005

Table 6. KRAS mutational status in the primary tumor according to metastatic site (whole series of 230 patients).

	Metastatic site	WT	Mutated	Total	P
KRAS (colon)					0.019
	liver	91 (66%)	46 (34%)	137	
	lung	12 (41%)	17 (59%)	29	
KRAS (rectum)					0.304
	liver	25 (60%)	17 (40%)	42	
	lung	10 (45%)	12 (55%)	22	

doi:10.1371/journal.pone.0008199.t006

with a small number of patients did not reproduce this result and did not demonstrate any influence of *KRAS* mutations on survival [12]. Thus, the prognostic value of *KRAS* mutational status remains controversial. Our results are in agreement with the RASCAL study and suggest a poorer prognosis for patients with *KRAS*-mutated primary tumors, with a significant association between *KRAS* mutational status and a shorter disease-free survival. By contrast, no association was found between *KRAS* status and overall survival. This can be explained by the administration of chemotherapy after relapse. The multivariate analysis shows that the presence of *KRAS* mutations is an independent prognostic factor in the prediction of disease-free survival (reaching statistical significance), thus highlighting the relevance of *KRAS* mutational status in the present series of patients. Regarding a potential influence of the mutation type on prognosis, our results, in contrast to the RASCAL study, show no differences with respect to mutation type. Of course, the potential value of *KRAS* mutations as a prognostic factor shown in this study must be taken cautiously, due to the limited and particular series of patients evaluated.

In summary, our findings suggest that *KRAS*-mutated primary CRC tumors tend to metastasize more frequently to the lung and are associated with a higher rate of relapse after resection of the metastases. This finding could be of clinical interest with regard to the follow-up of patients with *KRAS*-mutated primary CRC tumors, and thus merits further investigation.

Methods

Ethics Statement

The Ethical Committee of the La Paz University Hospital in Madrid, Spain, approved the current study. All patients were informed and consented in writing.

Eligible Patients

One hundred and ten patients with metastatic CRC with available primary tumor and paired metastatic specimens were selected from a database of patients from La Paz University Hospital in Madrid. This study was approved by the hospital's ethics committee. The patients were diagnosed with metastatic CRC between 1997 and 2007. Of the 326 cases of metastatic CRC diagnosed during this time period, study inclusion was limited to those with curative metastasis resection, available tissue specimens (both from the primary tumor and related metastases), available follow-up data after metastasis removal, and successful *KRAS* mutational status analysis. The median follow-up after surgery was 10 months (range: 0–144 months). All tumors were histologically confirmed to be colorectal adenocarcinomas. In

addition, pathology reports included information on the tumor size, tumor size, pathological stage, tumor grade (based on the degree of histological differentiation), presence or absence of lymph node metastasis, tumor growth pattern (infiltrative or expansive), presence or absence of vascular and lymphatic invasion, and presence or absence of tumor lymphocytic infiltrates. The primary stage has been classified into 4 stages according to WHO criteria. The number and size of metastases were determined by diagnostic imaging, either with abdominal and pelvic computed tomography or with magnetic resonance imaging. Metastasis resection was performed when there was no evidence of extra-hepatic disease, ensuring enough functioning residual liver after resection (approximately 25%–30% of normal liver volume) to provide hepatic function postoperatively, adjusted based on existing liver disease such as cirrhosis or hepatitis. Metastatic samples were obtained from either the liver or the lung. These metastatic samples were obtained from either synchronous or metachronous lesions. Patients received one of three different chemotherapy regimens after metastasis resection (described in Table 1).

After the discovery of the discordance between *KRAS* mutations in liver and lung metastases, an additional series of 128 metastatic CRC patients (86 with liver metastases, 34 with lung metastases, and 8 with other types of metastases) from La Paz Hospital were prospectively collected between 2007 and 2009, to validate the hypothesis of a higher rate of *KRAS* mutations in patients with lung metastases. These patients had unresectable metastatic disease. *KRAS* status in the primary tumor was determined for clinical purposes prior to cetuximab administration. The only clinicopathological data collected for these patients was the site of the primary tumor (colon vs rectum). *KRAS* analysis was performed using the TheraScreen K-RAS mutation test kit (DxS Diagnostic Innovations) by an independent central laboratory in Madrid, following the manufacturer's instructions.

DNA Extraction

Paraffin-embedded primary tumor specimens ($n=110$) and metastatic tumor specimens ($n=110$) containing at least 70% tumor cells were selected for each patient. Tumor blocks were macro-dissected using a safety blade when samples were less than 70% enriched with tumoral cells. Metastatic tumors were located in the liver ($n=93$) and the lung ($n=17$). DNA was isolated from 15–7-µm paraffin sections. Tissue sections were deparaffinized with xylol and rehydrated with downgraded alcohols. Tissues were digested with Proteinase K, and DNA was isolated using a MasterPure DNA Kit (Epicentre, Biotechnologies). In each instance, negative controls were amplified by PCR and included in the experiment.

KRAS Mutation Analysis

A polymerase-chain reaction (PCR) was performed to amplify 139 bp of exon 2 in *KRAS* using specific primers (kindly donated by Dr. Laurent-Pug's laboratory) and under PCR conditions described previously [15]. PCR primer sequences/conditions are available upon request. The efficiency and quality of the amplification PCR were confirmed by running the PCR products on a 2% agarose gel. A negative control containing all the components of the PCR except the template was included in each PCR reaction. DNA Amplified products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Crawley, UK), according to the manufacturer's instructions. Amplification products were bidirectionally sequenced via the fluorescent dye terminator method in a multi-

capillary DNA sequence using the services of the scientific park of Madrid (Madrid, Spain). Presence of mutation was accepted when in chromatographic peak height was 25% or higher the peak of the wild type reference.

Statistical Analyses

Fisher's exact test was used to examine the association between *KRAS* mutational status and various clinicopathological features. Concordance between the primary tumor and related metastases was analyzed using the kappa index, and discordance was analyzed using the McNemar test of symmetry. Disease-free survival and overall survival analyses were calculated according to the Kaplan-Meier method, and survival curves were compared using the log-rank test. Disease-free survival was defined as the time from surgical resection of the metastases until the time of documented

tumor progression or death. A Cox proportional hazards multivariate regression analysis was performed. $P < 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using SPSS version 22.0 (Chicago, IL, USA).

Acknowledgments

We thank Esther Díaz and María de Miguel for expert technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiment: PC, JF. Performed the experiment: PC, RL. Analyzed the data: PC, MLG, CA, RM, JHCC, CBI, JB, VMG, JL, F.C, MGB, JF. Contributed reagents/materials/analysis tools: JL. Wrote the paper: PC, MLG, CA, RM, JF.

References

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, et al. (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58: 5–26.
2. Teuma C, Nordlinger B (2007) Colorectal metastasis (liver and lung). *Surg Clin North Am* 82: 1075–1090, x–xi.
3. Tseng Y, Cohen AM, Forster JG, Ecker WE, Turnbull AE, et al. (1997) Liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol* 15: 939–946.
4. Lockhart AC, Berlin JD (2005) The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy. *Semin Oncol* 32: 52–60.
5. Jain GW, Shah SR (2008) Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Thrombolytic* 20: 742–754.
6. Grandt M, V. Madhus III (2008) Epidermal growth factor receptor and cancer: control of oncogenic signaling by endocytosis. *J Cell Mol Med* 12: 1527–1534.
7. Hansen K, Kitzman M, O'Connor A, Dittler J, Mounier H, et al. (2004) Mutation analysis of the *ERAF*, *ARAF* and *RAT-1* genes in human colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 25: 527–533.
8. Barabási M (1987) *os* genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779–827.
9. Wong R, Cunningham D (2008) Using predictive biomarkers to select patients with advanced colorectal cancer for treatment with epidermal growth factor receptor antibodies. *J Clin Oncol* 26: 5669–5670.
10. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Vogelstein AC, et al. (1989) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525–532.
11. Sacchi D, Longo F, Vicenzi B, Rotariu I, Stău I, et al. (2008) High concordance of *KRAS* status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncology* 13: 1270–1275.
12. Estévez-Giraldó MC, Forrester JL, Trakoual M, Flanigan E, Forrester J, et al. (2008) *K-Ras* mutation and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 14: 4830–4835.
13. Karapatis CH, Khushfara-Ford S, Jordan HJ, O'Callaghan CJ, Tu D, et al. (2008) *K-ras* mutation and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359: 1757–1765.
14. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena A, et al. (2008) Wild-type *KRAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 1626–1634.
15. Liaw A, Bachter JB, Le Guez D, Boige V, Lanté B, et al. (2008) *KRAS* mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 68: 3992–3995.
16. Andrejew HJ, Neuman AR, Cunningham D, Oates J, Dias RR, et al. (2001) *K-ras* mutations in patients with colorectal cancer: the TRASCAL II study. *Br J Cancer* 85: 690–696.
17. Tabernero J, Van Cutsem E, Dias-Rubio E, Gerasimov A, Harbison Y, et al. (2007) Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25: 5225–5232.
18. Oliveira C, Velho S, Mourinho C, Brito A, Tava A, et al. (2007) *KRAS* and *ERAF* oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene* 26: 159–163.
19. Amado S, Sartre-Elachi A, Veronesi JM, Garbi V, Saracino G, et al. (2008) Mutation of *KRAS* and *ERAF* in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 4217–4219.
20. Riera N, Mounier A, Bernado JE, Riquelme L, Amador MJ (2008) Lung metastases from colorectal cancer: surgical resection and prognostic factors. *Eur J Cardiothorac Surg* 35: 444–449.
21. Oudejans JJ, Sieber E, Toetmiller FA, Miel WJ, Rodenhuis S. (1991) Differential activation of *c-myc* genes by point mutation in human colon cancer with metastases to either lung or liver. *Br J Cancer* 63: 675–679.

20 TRABAJOS ACEPTADOS PENDIENTES DE PUBLICACIÓN

-**“Analysis of the concordance in the EGFR pathway status between primary tumors and related metastases of colorectal cancer patients: Implications for cancer therapy”**. Paloma Cejas, Miriam López-Gómez, Jaime Feliu et al. Pendiente de publicación en “Current Cancer Drug Targets”.

-**“Management of colorectal cancer patients after resection of liver metastases: can we offer a tailored treatment?”**. Miriam López-Gómez, Paloma Cejas, Jaime Feliu et al. Pendiente de segunda revisión en “Critical Reviews in Oncology Hematology”.

REFERENCIAS

21 REFERENCIAS

1. Abe, J. et al. "Larger and more invasive colorectal carcinoma contains larger amounts of plasminogen activator inhibitor type 1 and its relative ratio over urokinase receptor correlates well with tumor size." *Cancer* 86.12 (1999): 2602-11.
2. Adam, R. et al. "Hepatic resection after rescue cetuximab treatment for colorectal liver metastases previously refractory to conventional systemic therapy." *J Clin Oncol.* 25 (2007):4593-4602.
3. Adjei, A. A. "A review of the pharmacology and clinical activity of new chemotherapy agents for the treatment of colorectal cancer." *Br.J.Clin.Pharmacol.* 48.3 (1999): 265-77.
4. Alazzouzi, H. et al. "SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer." *Clin.Cancer Res.* 11.7 (2005): 2606-11.
5. Alberts, SR. et al. "Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study." *J Clin Oncol.*23 (2005):1-7.
6. Alberts, SR, et al. "Adjuvant mFOLFOX6 with or without cetuximab in KRAS wild type patients with resected stage III colon cancer: results from NCCTG Intergroup phase III trial N0147" *J Clin Oncol* (2010): 28:18s suppl; abstr CRA3507.
7. Aldrighetti, L. et al. "Prognostic factors for long-term outcome of hepatic resection for colorectal liver metastases". *Chir Ital* 57(5) (2005): 555-70.
8. Amado, R. G. et al. "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 26.10 (2008): 1626-34.
9. Arteaga, C. L. "Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?" *Oncologist.* 7 Suppl 4 (2002): 31-39.
10. Arteaga, C. L. "Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia." *Semin.Oncol.* 29.5 Suppl 14 (2002): 3-9.
11. Backus, H. H. et al. "5-Fluorouracil induced Fas upregulation associated with apoptosis in liver metastases of colorectal cancer patients." *Ann.Oncol.* 12.2 (2001): 209-16.
12. Backus, H. H. et al. "Differential expression of cell cycle and apoptosis related proteins in colorectal mucosa, primary colon tumours, and liver metastases." *J.Clin.Pathol.* 55.3 (2002): 206-11.
13. Bacman, D. et al. "TGF-beta receptor 2 downregulation in tumour-associated stroma worsens prognosis and high-grade tumours show more tumour-associated macrophages and lower TGF-beta1 expression in colon carcinoma: a retrospective study." *BMC.Cancer* 7 (2007): 156.

14. Baek, J. H. et al. "Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis." *Oncogene* 19.40 (2000): 4621-31.
15. Balleste, B. et al. "Detection of metachronous neoplasms in colorectal cancer patients: identification of risk factors." *Dis.Colon Rectum* 50.7 (2007): 971-80.
16. Ban, N. et al. "Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide." *Cancer Res.* 56.15 (1996): 3577-82.
17. Barbier, A. et al. "Coexpression of biological key modulators in primary colorectal carcinomas and related metastatic sites: implications for treatment with cetuximab." *Bull.Cancer* 97.2 (2010): E9-E15.
18. Bardelli, A. and S. Siena. "Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 28.7 (2010): 1254-61.
19. Beckner, M. E. "Factors promoting tumor angiogenesis." *Cancer Invest* 17.8 (1999): 594-623.
20. Belluco, C. et al. "p53 nuclear protein overexpression in colorectal cancer: a dominant predictor of survival in patients with advanced hepatic metastases." *J Clin Oncol.* 14 (1996):2696-2701.
21. Benedetti, P. et al. "Camptothecin resistance from a single mutation changing glycine 363 of human DNA topoisomerase I to cysteine." *Cancer Res.* 53.18 (1993): 4343-48.
22. Bird, N. C., D. Mangnall, and A. W. Majeed. "Biology of colorectal liver metastases: A review." *J.Surg.Oncol.* 94.1 (2006): 68-80.
23. Bishop, J. M. "Molecular themes in oncogenesis." *Cell* 64.2 (1991): 235-48.
24. Bokemeyer, C. et al. "Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 27.5 (2009): 663-71.
25. Bongiorno, P. F. et al. "E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and in Barrett's oesophagus." *Br.J.Cancer* 71.1 (1995): 166-72.
26. Boulay, J. L. et al. "SMAD4 is a predictive marker for 5-fluorouracil-based chemotherapy in patients with colorectal cancer." *Br.J.Cancer* 87.6 (2002): 630-34.
27. Bruns, C. J. et al. "Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases." *Cancer* 89.3 (2000): 488-99.
28. Burkert, J. et al. "Stem cells and cancer: an intimate relationship." *J. Pathol.* 209.3 (2006):287-97
29. Bustin, S. A. "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J.Mol.Endocrinol.* 29.1 (2002): 23-39.

30. Bustin, S. A. and P. J. Jenkins. "The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis and colorectal cancer." *Trends Mol.Med.* 7.10 (2001): 447-54.
31. Burger, JA, Kipps, TJ. "CXCR4: A key receptor in the crosstalks between tumor cells and their microenvironment". *Blood* 107(5) (2006):1761-7.
32. Cadigan, K. M. and Y. I. Liu. "Wnt signaling: complexity at the surface." *J.Cell Sci.* 119.Pt 3 (2006): 395-402.
33. Carraro, P. G. et al. "Obstructing colonic cancer: failure and survival patterns over a ten-year follow-up after one-stage curative surgery." *Dis.Colon Rectum* 44.2 (2001): 243-50.
34. Cascinu, S. et al. "Vascular endothelial growth factor expression, S-phase fraction and thymidylate synthase quantitation in node-positive colon cancer: relationships with tumor recurrence and resistance to adjuvant chemotherapy." *Ann.Oncol.* 12.2 (2001): 239-44.
35. Cassidy, J. et al. "Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 26.12 (2008): 2006-12.
36. Cejas, P. et al. "KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis." *PLoS.One.* 4.12 (2009): e8199.
37. Cejas, P. et al. "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression is downregulated in poorly differentiated breast invasive ductal carcinoma " *Free Radic Res* 41.6 (2007): 681-7.
38. Cervone, A., A. Sardi, and G. L. Conaway. "Intraoperative ultrasound (IOUS) is essential in the management of metastatic colorectal liver lesions." *Am.Surg.* 66.7 (2000): 611-15.
39. Chadeneau, C. et al. "Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer." *Cancer Res.* 55.12 (1995): 2533-36.
40. Chang, G. J. et al. "Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review." *J.Natl.Cancer Inst.* 99.6 (2007): 433-41.
41. Chen, J. et al. "Prognostic significance of c-erbB-2 and vascular endothelial growth factor in colorectal liver metastases." *Ann.Surg.Oncol.* 17.6 (2010): 1555-63.
42. Chen, S. L. and A. J. Bilchik. "More extensive nodal dissection improves survival for stages I to III of colon cancer: a population-based study." *Ann.Surg.* 244.4 (2006): 602-10.
43. Cho, E. et al. "Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies." *Ann.Intern.Med.* 140.8 (2004): 603-13.
44. Choi, H. N. et al. "Serum response factor enhances liver metastasis of colorectal carcinoma via alteration of the E-cadherin/beta-catenin complex." *Oncol.Rep.* 21.1 (2009): 57-63.

45. Citarda, F. et al. "Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence." *Gut* 48.6 (2001): 812-15.
46. Cohen, M. P., M. A. Machado, and P. Herman. "[The impact of intra operative ultrasound in metastases liver surgery]." *Arq Gastroenterol.* 42.4 (2005): 206-12.
47. Colucci, G. et al. "Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale." *J.Clin.Oncol.* 23.22 (2005): 4866-75.
48. Compton, C. et al. "American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group." *Cancer* 88.7 (2000): 1739-57.
49. Croce, C. M. "Oncogenes and cancer." *N.Engl.J.Med.* 358.5 (2008): 502-11.
50. Crompton, M. "Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis." *Curr.Opin.Cell Biol.* 12.4 (2000): 414-19.
51. Cunningham, D. et al. "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." *N.Engl.J.Med.* 351.4 (2004): 337-45.
52. Das, PM. and Singal, R. "DNA methylation and cancer." *J. Clin. Oncol.* 22.22 (2004): 4632-42.
53. de Gramont, A. et al. "Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 18.16 (2000): 2938-47.
54. de Gramont, A. et al. "AVANT: results from a randomized, three arm multinational phase III study to investigate bevacizumab with either XELOX or FOLFOX4 versus FOLFOX4 alone as adjuvant treatment for colon cancer" *J Clin Oncol* 2011(suppl 4, abstr 362).
55. de Reynies, A. et al. "KRAS mutation signature in colorectal tumors significantly overlaps with the cetuximab response signature." *J.Clin.Oncol.* 26.13 (2008): 2228-30.
56. de Roock, W. et al. "Association of KRAS pG13D mutation with outcome in patients with refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab" *JAMA* 2010 304 (16): 1812-1820.
57. Delektorskaya, V. V. et al. "Prognostic significance of expression of matrix metalloproteinase in colorectal adenocarcinomas and their metastases." *Bull.Exp.Biol.Med.* 143.4 (2007): 455-58.
58. Dellacasagrande, J. et al. "Liver metastasis of cancer facilitated by chemokine receptor CCR6." *Scand.J.Immunol.* 57.6 (2003): 534-44.
59. Denys, H. et al. "Differential impact of TGF-beta and EGF on fibroblast differentiation and invasion reciprocally promotes colon cancer cell invasion." *Cancer Lett.* 266.2 (2008): 263-74.

60. Di Nicolantonio, F. et al. "Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 26.35 (2008): 5705-12.
61. Diasio, R. B. and B. E. Harris. "Clinical pharmacology of 5-fluorouracil." *Clin.Pharmacokinet.* 16.4 (1989): 215-37.
62. Domont, J. et al. "Catalytic subunit of human telomerase reverse transcriptase is an independent predictor of survival in patients undergoing curative resection of hepatic colorectal metastases: a multicenter analysis." *J.Clin.Oncol.* 23.13 (2005): 3086-93.
63. Douillard, J.Y. et al. "Randomized phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin (FOLFOX 4) versus FOLFOX 4 alone as first line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. " *J Clin Oncol.* 28 (2010): 4697-4705.
64. Dwinell, M. B. et al. "Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells." *Gastroenterology* 117.2 (1999): 359-67.
65. Edge, SB. et al (Eds). "AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 7th ed", Springer, New York 2010. p 143.
66. Edler, D. et al. "Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival." *Clin.Cancer Res.* 6.2 (2000): 488-92.
67. Edler, D. et al. "Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy." *J.Clin.Oncol.* 20.7 (2002): 1721-28.
68. Ellis, L. M. and D. J. Hicklin. "Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy." *Clin.Cancer Res.* 14.20 (2008): 6371-75.
69. Etienne-Grimaldi, M. C. et al. "K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy." *Clin.Cancer Res.* 14.15 (2008): 4830-35.
70. Evrard, A. et al. "Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase." *Br.J.Cancer* 80.11 (1999): 1726-33.
71. Falcone, A. et al. "Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. " *J Clin Oncol.* 25 (2008):1670-1676.
72. Fearon, E. R. and B. Vogelstein. "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* 61.5 (1990): 759-67.
73. Figueras, J. et al. "Surgical resection of colorectal liver metastases in patients with expanded indications: a single-center experience with 501 patients. " *Dis Colon rectum.* 50 (2007):478-488.

74. Flamen, P. et al. "Unexplained rising carcinoembryonic antigen (CEA) in the postoperative surveillance of colorectal cancer: the utility of positron emission tomography (PET)." *Eur.J.Cancer* 37.7 (2001): 862-69.
75. Folkman, J. et al. "Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia." *Nature* 339.6219 (1989): 58-61.
76. Folprecht, G. et al. "Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates." *Ann Oncol* 16 (2005):1311-1319.
77. Folprecht, G. et al. "Randomized multicenter study of cetuximab plus FOLFOX or cetuximab plus FOLFIRI in neoadjuvant treatment of non-resectable colorectal liver metastases (CLM)." *Ann Oncol.* 19 (2008):viii 168 (Abstr 510PD)
78. Fong, Y. et al. "Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases." *Ann Surg* 230.3 (1999): 309-18.
79. Freeman, D. J. et al. "Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone." *Clin.Colorectal Cancer* 7.3 (2008): 184-90.
80. Freeman, H. J. "Colorectal cancer risk in Crohn's disease." *World J.Gastroenterol.* 14.12 (2008): 1810-11.
81. Fuchs, C. S. et al. "Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study." *J.Clin.Oncol.* 25.30 (2007): 4779-86.
82. Furukawa, H. et al. "Positron emission tomography scanning is not superior to whole body multidetector helical computed tomography in the preoperative staging of colorectal cancer." *Gut* 55.7 (2006): 1007-11.
83. Gervaz, P. et al. "Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location." *Dis.Colon Rectum* 44.3 (2001): 364-72.
84. Gervaz, P. et al. "Proximal location of colon cancer is a risk factor for development of metachronous colorectal cancer: a population-based study." *Dis.Colon Rectum* 48.2 (2005): 227-32.
85. Gervaz, P., P. Bucher, and P. Morel. "Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications." *J.Surg.Oncol.* 88.4 (2004): 261-66.
86. Ghadjar, P. et al. "Chemokine receptor CCR6 expression level and liver metastases in colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 24.12 (2006): 1910-16.
87. Giantonio, B. J. et al. "A phase II study of high-dose bevacizumab in combination with irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin, as initial therapy for advanced colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group study E2200." *Ann.Oncol.* 17.9 (2006): 1399-403.
88. Giatromanolaki, A. et al. "Bax protein expression in colorectal cancer: association with p53, bcl-2 and patterns of relapse." *Anticancer Res.* 21.1A (2001): 253-59.

89. Giovanella, B. C. et al. "DNA topoisomerase I--targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts." *Science* 246.4933 (1989): 1046-48.
90. Goldstein, N. S. and J. R. Turner. "Pericolic tumor deposits in patients with T3N+MO colon adenocarcinomas: markers of reduced disease free survival and intra-abdominal metastases and their implications for TNM classification." *Cancer* 88.10 (2000): 2228-38.
91. Gonzalez, E. C. et al. "Predictors of proximal vs. distal colorectal cancers." *Dis.Colon Rectum* 44.2 (2001): 251-58.
92. Goto, S. et al. "Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells." *Free Radic.Res.* 31.6 (1999): 549-58.
93. Grothey, A. et al. "Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment." *J.Clin.Oncol.* 22.7 (2004): 1209-14.
94. Gruenberger, B. et al. "Importance of response to neoadjuvant chemotherapy in potentially curable colorectal cancer liver metastases." *BMC Cancer*.8 (2008):120.
95. Gruenberger, B. et al. "Bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin as neoadjuvant therapy for patients with potentially curable metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol*.26 (2008):1830-1835.
96. Guichard, S. et al. "CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues." *Br.J.Cancer* 80.3-4 (1999): 364-70.
97. Harley, C. B. et al. "Telomerase, cell immortality, and cancer." *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 59 (1994): 307-15.
98. Harris, R. E., J. Beebe-Donk, and G. A. Alshafie. "Similar reductions in the risk of human colon cancer by selective and nonselective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors." *BMC.Cancer* 8.1 (2008): 237.
99. Hatch, S. B. et al. "Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors." *Clin.Cancer Res.* 11.6 (2005): 2180-87.
100. Hecht, J. R. et al. "Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer." *Cancer* 110.5 (2007): 980-88.
101. Herold-Mende, C. et al. "Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells." *Lab Invest* 79.12 (1999): 1573-82.
102. Hiyama, E. and K. Hiyama. "Clinical utility of telomerase in cancer." *Oncogene* 21.4 (2002): 643-49.
103. Hochster, H. S. et al. "Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the TREE Study." *J.Clin.Oncol.* 26.21 (2008): 3523-29.

104. Hoeijmakers, J. H. "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* 411.6835 (2001): 366-74.
105. Hurwitz, H. I. et al. "Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 23.15 (2005): 3502-08.
106. Ikeguchi, M., M. Makino, and N. Kaibara. "Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma." *J.Surg.Oncol.* 77.3 (2001): 201-07.
107. Illemann, M. et al. "MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases." *Mol.Cancer Res.* 4.5 (2006): 293-302.
108. Illemann, M. et al. "Two distinct expression patterns of urokinase, urokinase receptor and plasminogen activator inhibitor-1 in colon cancer liver metastases." *Int.J.Cancer* 124.8 (2009): 1860-70.
109. Inokuchi, M. et al. "Gene expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 53.5 (2004): 391-96.
110. Italiano, A. et al. "Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors for which FISH analysis does not detect an increase in EGFR gene copy number." *Ann.Surg.Oncol.* 15.2 (2008): 649-54.
111. Italiano, A. et al. "KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications." *Ann.Surg.Oncol.* 17.5 (2010): 1429-34.
112. Iwatsuki, S., et al. "Hepatic resection for metastatic colorectal adenocarcinoma: a proposal of a scoring system". *J Am Coll Surg.* 189.3 (1999): 291-9.
113. Janne, P. A. and R. J. Mayer. "Chemoprevention of colorectal cancer." *N.Engl.J.Med.* 342.26 (2000): 1960-68.
114. Jass, J. R. "Serrated adenoma of the colorectum and the DNA-methylator phenotype." *Nat.Clin.Pract.Oncol.* 2.8 (2005): 398-405.
115. Jemal, A. et al. "Global cancer statistics." *CA Cancer J.Clin.* 61.2 (2011): 69-90.
116. Jenuwein, T. and C. D. Allis. "Translating the histone code." *Science* 293.5532 (2001): 1074-80.
117. Jhawer, M. et al. "PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab." *Cancer Res.* 68.6 (2008): 1953-61.
118. Johnston, P. G. et al. "The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 12.12 (1994): 2640-47.
119. Johnston, P. G. et al. "Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors." *Cancer Res.* 55.7 (1995): 1407-12.

120. Jordan, N. J. et al. "Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells." *J.Clin.Invest* 104.8 (1999): 1061-69.
121. Kanamaru, T. et al. "Telomerase activity and hTERT mRNA in development and progression of adenoma to colorectal cancer." *Int.J.Mol.Med.* 10.2 (2002): 205-10.
122. Karapetis, C. S. et al. "K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer." *N.Engl.J.Med.* 359.17 (2008): 1757-65.
123. Kelly, H. and R. M. Goldberg. "Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence." *J.Clin.Oncol.* 23.20 (2005): 4553-60.
124. Kemeny, N. et al. "Hepatic arterial infusion of chemotherapy after resection of hepatic metastases from colorectal cancer. " *N Engl J Med* 341 (1999):2039-48.
125. Kim, J. et al. "Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival." *J.Clin.Oncol.* 23.12 (2005): 2744-53.
126. Kim, J. et al. "Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome." *Ann.Surg.* 244.1 (2006): 113-20.
127. Kim, J. G. et al. "Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer." *Clin.Cancer Res.* 14.1 (2008): 62-66.
128. Kim, M. S. and Y. J. Park. "Detection and treatment of synchronous lesions in colorectal cancer: the clinical implication of perioperative colonoscopy." *World J.Gastroenterol.* 13.30 (2007): 4108-11.
129. Knab, A. M., J. Fertala, and M. A. Bjornsti. "Mechanisms of camptothecin resistance in yeast DNA topoisomerase I mutants." *J.Biol.Chem.* 268.30 (1993): 22322-30.
130. Kobayashi, H. et al. "Messenger RNA expression of TS and ERCC1 in colorectal cancer and matched liver metastasis." *Int.J.Oncol.* 33.6 (2008): 1257-62.
131. Kobayashi, N. et al. "Pyrimidine nucleoside phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase indicate chemosensitivity of human colon cancer specimens to doxifluridine and 5-fluorouracil, respectively." *J.Infect.Chemother.* 5.3 (1999): 144-48.
132. Koh, K. H. et al. "Differential gene expression profiles of metastases in paired primary and metastatic colorectal carcinomas." *Oncology* 75.1-2 (2008): 92-101.
133. Kondo, T., T. Setoguchi, and T. Taga. "Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101.3 (2004): 781-86.
134. Kondo, Y. et al. "Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line." *Clin.Cancer Res.* 6.2 (2000): 622-30.

135. Konno, H. et al. "Urokinase receptor and vascular endothelial growth factor are synergistically associated with the liver metastasis of colorectal cancer." *Jpn.J.Cancer Res.* 92.5 (2001): 516-23.
136. Koopman, M. et al. "Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial." *Lancet* 370.9582 (2007): 135-42.
137. Kostopoulos, I. et al. "Topoisomerase I but not thymidylate synthase is associated with improved outcome in patients with resected colorectal cancer treated with irinotecan containing adjuvant chemotherapy." *BMC.Cancer* 9 (2009): 339.
138. Kumar, R. R. et al. "Prevalence of left-sided colorectal cancer and benefit of flexible sigmoidoscopy: a county hospital experience." *Am.Surg.* 73.10 (2007): 994-97.
139. Kuramochi, H. et al. "Vascular endothelial growth factor messenger RNA expression level is preserved in liver metastases compared with corresponding primary colorectal cancer". *Clin Cancer Res.* 12.1 (2006): 29-33.
140. Kuramochi, H. et al. "5-fluorouracil-related gene expression levels in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases". *Int J. Cancer.* 119-3 (2006): 522-6.
141. Kuramochi, H. et al. "Epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels and protein expression levels in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 65.5 (2010): 825-31.
142. Kykalos, S. et al. "Tissue Expression of the Proteins Fas and Fas Ligand in Colorectal Cancer and Liver Metastases." *J.Gastrointest.Cancer* (2011).
143. Lagergren, J., W. Ye, and A. Ekbom. "Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis?" *Gastroenterology* 121.3 (2001): 542-47.
144. Landis, JR. and Koch, GG. "An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers". *Biometrics* 33 (1977):363-74.
145. Langer, B. et al. "Fluorouracil (FU) plus I-Leucovorin (I-LV) versus observation after potentially curative resection of liver or lung metastases from colorectal cancer (CRC): results of the ENG (EORTC/NCIC CTG/GIVIO) randomized trial. " *Proc Am Soc Clin Oncol.*21 (2002)(Abstr 592).
146. Lansiaux, A. et al. "Topoisomerase I-DNA covalent complexes in human colorectal cancer xenografts with different p53 and microsatellite instability status: relation with their sensitivity to CTP-11." *Anticancer Res.* 21.1A (2001): 471-76.

147. Laurent-Puig, P. et al. "Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer." *J.Clin.Oncol.* 27.35 (2009): 5924-30.
148. Lawler, J. "The structural and functional properties of thrombospondin." *Blood* 67.5 (1986): 1197-209.
149. Le, P., L. Mehtari, and C. Billey. "[Carcinoma of the transverse colon]." *J.Chir (Paris)* 143.5 (2006): 285-93.
150. Leslie, A. et al. "The colorectal adenoma-carcinoma sequence." *Br.J.Surg.* 89.7 (2002): 845-60.
151. Liebig, C. et al. "Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer " *J Clin Oncol* 27.31 (2009): 5131-7
152. Lievre, A. et al. "KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer." *Cancer Res.* 66.8 (2006): 3992-95.
153. Liotta, L. A. et al. "Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen." *Nature* 284.5751 (1980): 67-68.
154. Liotta, L. A., P. S. Steeg, and W. G. Stetler-Stevenson. "Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation." *Cell* 64.2 (1991): 327-36.
155. Linot, B. et al. "Impact of PI3K, BRAF and KRAS mutations on efficacy on intensified FOLFIRI + cetuximab regimen in advanced colorectal cancer " (Abstract No.365)(2010). *Gastrointestinal Cancers Symposium*:149.
156. Lise, M., Bacchetti, S., and Da Pian, P. "Patterns of recurrence after resection of colorectal liver metastases: prediction by models of outcome analysis". *World J Surg.* 25.5 (2001): 638-44.
157. López Abente, G. et al. "Situación del Cáncer en España: incidencia. " *An.Sist Sanit Navar.* 27.2 (2004):165-173.
158. Loupakis, F. et al. "PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 27.16 (2009): 2622-29.
159. Lynch, H. T. et al. "Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management." *Fam.Cancer* 7.1 (2008): 27-39.
160. Lyss, A. P. et al. "Severe 5-fluorouracil toxicity in a patient with decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity." *Cancer Invest* 11.2 (1993): 239-40.
161. Macari, M. and E. J. Bini. "CT colonography: where have we been and where are we going?" *Radiology* 237.3 (2005): 819-33.
162. Maeda, K. et al. "Expression of thrombospondin-1 inversely correlated with tumor vascularity and hematogenous metastasis in colon cancer." *Oncol.Rep.* 8.4 (2001): 763-66.

163. Maugham, TS. et al. "Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase III MRC COIN trial " *Lancet* 377 .9783 (2011):2103-14.
164. McAndrew, M. R. and A. K. Saba. "Efficacy of routine preoperative computed tomography scans in colon cancer." *Am.Surg.* 65.3 (1999): 205-08.
165. McArdle, C. S. and D. J. Hole. "Emergency presentation of colorectal cancer is associated with poor 5-year survival." *Br.J.Surg.* 91.5 (2004): 605-09.
166. McArdle, C. S., D. C. McMillan, and D. J. Hole. "The impact of blood loss, obstruction and perforation on survival in patients undergoing curative resection for colon cancer." *Br.J.Surg.* 93.4 (2006): 483-88.
167. Mège, RM. et al. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18 (2006): 541-548.
168. Metzger, R. et al. "ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy." *J.Clin.Oncol.* 16.1 (1998): 309-16.
169. Metzger, R. et al. "High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil." *Clin.Cancer Res.* 4.10 (1998): 2371-76.
170. Michelassi, F. et al. "Verification of a new clinicopathologic staging system for colorectal adenocarcinoma." *Ann.Surg.* 214.1 (1991): 11-18.
171. Mills, A. A. "p53: link to the past, bridge to the future." *Genes Dev.* 19.18 (2005): 2091-99.
172. Milsom, J. W. et al. "Prospective, blinded comparison of laparoscopic ultrasonography vs. contrast-enhanced computerized tomography for liver assessment in patients undergoing colorectal carcinoma surgery." *Dis.Colon Rectum* 43.1 (2000): 44-49.
173. Mitry, E. et al. "Adjuvant chemotherapy improves survival after resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. " *J.Clin. Oncol.*26 (2008):4906-4911.
174. Miyaki, M. et al. "Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis." *Oncogene* 18.20 (1999): 3098-103.
175. Mlecnik B et al. "Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction" *J Clin Oncol* 20.29(6) (2011): 610-8
176. Mocellin, S. et al. "Fluoropyrimidine -HA1 (hepatic arterial infusión) versus systemic chemotherapy (SCT) for unresectable liver metastases from colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;4:CD007823)

177. Molinari, F. et al. "Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant." *Br.J.Cancer* 100.7 (2009): 1087-94.
178. Moller, P. et al. "Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium." *Int.J.Cancer* 57.3 (1994): 371-77.
179. Mooteri, S. et al. "Tumor angiogenesis in primary and metastatic colorectal cancers." *Dis.Colon Rectum* 39.10 (1996): 1073-80.
180. Moroni, M. et al. "Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study". *Lancet Oncol* 6 (2005):279-86.
181. Nadal, C., J. Maurel, and P. Gascon. "Is there a genetic signature for liver metastasis in colorectal cancer?" *World J.Gastroenterol.* 13.44 (2007): 5832-44.
182. Nagata, S. and P. Golstein. "The Fas death factor." *Science* 267.5203 (1995): 1449-56.
183. Neal, C. P. et al. "Molecular prognostic markers in resectable colorectal liver metastases: a systematic review." *Eur.J.Cancer* 42.12 (2006): 1728-43.
184. Neel, N. F. et al. "Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking." *Cytokine Growth Factor Rev.* 16.6 (2005): 637-58.
185. Nehls, O. et al. "Low BAX protein expression correlates with disease recurrence in preoperatively irradiated rectal carcinoma." *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 61.1 (2005): 85-91.
186. Nehls, O. et al. "Prognostic implications of BAX protein expression and microsatellite instability in all non-metastatic stages of primary colon cancer treated by surgery alone." *Int.J.Colorectal Dis.* 24.6 (2009): 655-63.
187. Newland, R. C. et al. "Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients." *Cancer* 73.8 (1994): 2076-82.
188. Nishimura, T. et al. "Immunohistochemical staining for glutathione S-transferase predicts response to platinum-based chemotherapy in head and neck cancer." *Clin.Cancer Res.* 2.11 (1996): 1859-65.
189. Noike, T. et al. "Increased expression of thioredoxin-1, vascular endothelial growth factor, and redox factor-1 is associated with poor prognosis in patients with liver metastasis from colorectal cancer." *Hum.Pathol.* 39.2 (2008): 201-08.
190. Nordlinger, B et al. "Does chemotherapy prior to liver resection increase the potential for cure in patients with metastatic colorectal cancer? A report from the European Colorectal Metastases Treatment Group". *Eur J Cancer* 43 (2007):2037-2045.
191. Nordlinger, B. et al "Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognosis scoring system to improve case

- selection, based on 1568 patients. *Association Francaise de Chirurgie*. *Cancer* 77.7 (1996): 1254-62.
192. Nordlinger, B. et al. "Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial." *Lancet*. 371 (9617) (2008): 1007-1016.
 193. Nozoe, T. et al. "Fas ligand expression is correlated with metastasis in colorectal carcinoma." *Oncology* 65.1 (2003): 83-88.
 194. O'Connell, J. B. et al. "Do young colon cancer patients have worse outcomes?" *World J.Surg.* 28.6 (2004): 558-62.
 195. O'Connell, J. B., M. A. Maggard, and C. Y. Ko. "Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging." *J.Natl.Cancer Inst.* 96.19 (2004): 1420-25.
 196. Oh, S. W. et al. "The comparison of the risk factors and clinical manifestations of proximal and distal colorectal cancer." *Dis.Colon Rectum* 51.1 (2008): 56-61.
 197. Okayasu, I. et al. "Telomerase activity significantly correlates with cell differentiation, proliferation and lymph node metastasis in colorectal carcinomas." *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 124.8 (1998): 444-49.
 198. Okumura, K. et al. "Correlation between chemosensitivity and mRNA expression level of 5-fluorouracil-related metabolic enzymes during liver metastasis of colorectal cancer." *Oncol.Rep.* 15.4 (2006): 875-82.
 199. Paradiso, A. et al. "Topoisomerase-I, thymidylate synthase primary tumour expression and clinical efficacy of 5-FU/CPT-11 chemotherapy in advanced colorectal cancer patients." *Int.J.Cancer* 111.2 (2004): 252-58.
 200. Pardal, R., M. F. Clarke, and S. J. Morrison. "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." *Nat.Rev.Cancer* 3.12 (2003): 895-902.
 201. Park, D. J. et al. "A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer." *Cancer Res.* 61.24 (2001): 8654-58.
 202. Pawson, T. and N. Warner. "Oncogenic re-wiring of cellular signaling pathways." *Oncogene* 26.9 (2007): 1268-75.
 203. Peeters, M. et al. "Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol* 28 (2010): 4706-4713.
 204. Penna, C. and B. Nordlinger. "Colorectal metastasis (liver and lung)." *Surg.Clin.North Am.* 82.5 (2002): 1075-xi
 205. Penna, C. and B. Nordlinger. "Surgery of liver metastases from colorectal cancer: new promises." *Br.Med.Bull.* 64 (2002): 127-40.
 206. Perrone, F. et al. "PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients." *Ann.Oncol.* 20.1 (2009): 84-90.

207. Personeni, N. et al. "Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study." *Clin.Cancer Res.* 14.18 (2008): 5869-76.
208. Petrowsky, H. et al. "Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases". *EJSO.* 27 (2001):80-87.
209. Pohl, C., A. Hombach, and W. Kruis. "Chronic inflammatory bowel disease and cancer." *Hepatogastroenterology* 47.31 (2000): 57-70.
210. Pollanen, J., R. W. Stephens, and A. Vaheri. "Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells." *Adv.Cancer Res.* 57 (1991): 273-328.
211. Popat, S., A. Matakidou, and R. S. Houlston. "Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis." *J.Clin.Oncol.* 22.3 (2004): 529-36.
212. Poppe, B. et al. "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by
213. geometric averaging of multiple internal control genes". *Genome Biol.* 3.7. (2002) (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).
214. Portier, G. et al. "Multicenter randomized trial of adjuvant fluorouracil and folinic acid compared with surgery alone after resection of colorectal liver metastases: FFCD ACHBTH AURC 9002 trial. " *J Clin Oncol.* 24 (2006): 4976-4982.
215. Pozzo, C. et al. "Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients. " *Ann Oncol.*15 (2004):933-939.
216. Rabeneck, L. et al. "Risk of Proximal and Distal Colorectal Cancer Following Flexible Sigmoidoscopy: A Population-Based Cohort Study." *Am.J.Gastroenterol.* (2008).
217. Randal, J. "Antiangiogenesis drugs target specific cancers, mechanisms." *J.Natl.Cancer Inst.* 92.7 (2000): 520-22.
218. Reardon, J. T. et al. "Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-amine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts." *Cancer Res.* 59.16 (1999): 3968-71.
219. Reinacher-Schick, A. et al. "Loss of Smad4 correlates with loss of the invasion suppressor E-cadherin in advanced colorectal carcinomas." *J.Pathol.* 202.4 (2004): 412-20.
220. Ren, B. et al. "Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1." *Biochim.Biophys.Acta* 1765.2 (2006): 178-88.
221. Robertson, DJ. et al. "Survival after hepatic resection of colorectal cancer metastases: a national experience". *Cancer* 115(4) (2009): 752-9.
222. Robbins, P. F. and Y. Kawakami. "Human tumor antigens recognized by T cells." *Curr.Opin.Immunol.* 8.5 (1996): 628-36.

223. Rodel, C. et al. "Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 23.34 (2005): 8688-96.
224. Rodenhuis, S. "ras and human tumors." *Semin.Cancer Biol.* 3.4 (1992): 241-47.
225. Rodriguez-Manzaneque, J. C. et al. "Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98.22 (2001): 12485-90.
226. Rougier, P. et al. "Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer." *Lancet* 352.9138 (1998): 1407-12.
227. Rubie, C. et al. "Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases." *World J.Gastroenterol.* 12.41 (2006): 6627-33.
228. Rudmik, L. R. and A. M. Magliocco. "Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer." *J.Surg.Oncol.* 92.4 (2005): 347-59.
229. Russo, A. et al. "Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies." *Ann.Oncol.* 16 Suppl 4 (2005): iv44-iv49.
230. Saltz, L. B. et al. "Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor." *J.Clin.Oncol.* 22.7 (2004): 1201-08.
231. Saltz, L.B. et al. "Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. " *J Clin Oncol.* 26 (2008):2013-2019.
232. Santini, D. et al. "High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice." *Oncologist.* 13.12 (2008): 1270-75.
233. Sargiannidou, I., J. Zhou, and G. P. Tuszynski. "The role of thrombospondin-1 in tumor progression." *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 226.8 (2001): 726-33.
234. Sartore-Bianchi, A. et al. "Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer." *PLoS.One.* 4.10 (2009): e7287.
235. Sartore-Bianchi, A. et al. "PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies." *Cancer Res.* 69.5 (2009): 1851-57.
236. Sawai, H. et al. "Loss of PTEN expression is associated with colorectal cancer liver metastasis and poor patient survival." *BMC.Gastroenterol.* 8 (2008): 56.
237. Scaltriti, M. and J. Baselga. "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." *Clin.Cancer Res.* 12.18 (2006): 5268-72.

238. Scartozzi, M. et al. "Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies." *J.Clin.Oncol.* 22.23 (2004): 4772-78.
239. Schelwies, K. et al. "Analysis of p53/BAX in primary colorectal carcinoma: low BAX protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors." *Int.J.Cancer* 99.4 (2002): 589-96.
240. Schindl, M. et al. "Prognostic scoring in colorectal cancer liver metastases: development and validation ". *Arch Surg.* 140(2) (2005):183-9.
241. Schoenfeld, P. et al. "Colonoscopic screening of average-risk women for colorectal neoplasia." *N.Engl.J.Med.* 352.20 (2005): 2061-68.
242. Schumacher, P. et al. "The metastatic lymph node ratio predicts survival in colon cancer." *Am.J.Surg.* 194.6 (2007): 827-31.
243. Seetoo, D. Q. et al. "Quantitative expression of protein markers of plasminogen activation system in prognosis of colorectal cancer." *J.Surg.Oncol.* 82.3 (2003): 184-93.
244. Seymour, M. T. et al. "Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial." *Lancet* 370.9582 (2007): 143-52.
245. Shay, J. W. and S. Bacchetti. "A survey of telomerase activity in human cancer." *Eur.J.Cancer* 33.5 (1997): 787-91.
246. Sheehan, K. M. et al. "Prognostic relevance of Fas (APO-1/CD95) ligand in human colorectal cancer." *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 15.4 (2003): 375-80.
247. Shepherd, N. A., K. J. Baxter, and S. B. Love. "The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation." *Gastroenterology* 112.4 (1997): 1096-102.
248. Shirota, Y. et al. "ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy." *J.Clin.Oncol.* 19.23 (2001): 4298-304.
249. Shoji, Y. et al. "Quantification of telomerase activity in sporadic colorectal carcinoma: association with tumor growth and venous invasion." *Cancer* 88.6 (2000): 1304-09.
250. Smith, DL. et al. "Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) and ki-67 are better predictors of survival than established clinical indicators in patients undergoing curative hepatic resection for colorectal metastases". *Ann. Surg. Oncol* 11 (2004): 45-51.
251. Smothers, L. et al. "Emergency surgery for colon carcinoma." *Dis.Colon Rectum* 46.1 (2003): 24-30.
252. Sood A., Kaubisch, A. and Radjev, L. "Use of PTEN expression in the primary tumor as predictive marker for radiologic response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) based therapy in patients with

- metastatic colorectal cancer (mCRC) (Abstract No.367).(2010) ASCO Gastrointestinal Symposium;50.
253. Stelzner, F. "[Autoregulatory growth control of adenomatous polyps and carcinogenesis in the colorectal region. Basics of tumor surgery Part I]." *Chirurg* 77.11 (2006): 1048-55.
 254. Stoehlmacher, J. et al. "Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer." *J.Natl.Cancer Inst.* 94.12 (2002): 936-42.
 255. Strahl, B. D. and C. D. Allis. "The language of covalent histone modifications." *Nature* 403.6765 (2000): 41-45.
 256. Strand, S. et al. "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?" *Nat.Med.* 2.12 (1996): 1361-66.
 257. Sturm, I. et al. "Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases." *J.Clin.Oncol.* 17.5 (1999): 1364-74.
 258. Su, L. J. and L. Arab. "Alcohol consumption and risk of colon cancer: evidence from the national health and nutrition examination survey I epidemiologic follow-up study." *Nutr.Cancer* 50.2 (2004): 111-19.
 259. Sutton, C. D. et al. "Expression of thrombospondin-1 in resected colorectal liver metastases predicts poor prognosis." *Clin.Cancer Res.* 11.18 (2005): 6567-73.
 260. Taberero, J. et al. "Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 25.33 (2007): 5225-32.
 261. Takagi, S. et al. "Functional and phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from human primary and metastatic liver tumors and cultured in recombinant interleukin-2." *Cancer* 63.1 (1989): 102-11.
 262. Tamura, M. et al. "Vascular endothelial growth factor expression in metastatic pulmonary tumor from colorectal carcinoma: utility as a prognostic factor." *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 128.4 (2004): 517-22.
 263. Terada, H., T. Urano, and H. Konno. "Association of interleukin-8 and plasminogen activator system in the progression of colorectal cancer." *Eur.Surg.Res.* 37.3 (2005): 166-72.
 264. Tejpar, S. et al. "Influence of G13D mutations on outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first line chemotherapy with or without cetuximab ". *J Clin Oncol* 29 (abstr 3511) (2011).
 265. Tokunaga, T. et al. "Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer." *Br.J.Cancer* 77.6 (1998): 998-1002.
 266. Tominaga, T. et al. "Prognostic factors for patients with colon or rectal carcinoma treated with resection only. Five-year follow-up report." *Cancer* 78.3 (1996): 403-08.

267. Tournigand, C. et al. "FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study." *J.Clin.Oncol.* 22.2 (2004): 229-37.
268. Tricarico, C. et al. "Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies." *Anal.Biochem.* 309.2 (2002): 293-300.
269. Tsuji, T. et al. "Tumor dihydropyrimidine dehydrogenase expression is a useful marker in adjuvant therapy with oral fluoropyrimidines after curative resection of colorectal cancer." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 54.6 (2004): 531-36.
270. Tveit KM. "Randomized phase III study of 5 fluorouracil/folate/oxaliplatin given continuously or intermittently with or without cetuximab as first line treatment of metastatic colorectal cancer. The Nordic VIII study (NCT001 45314) by the Nordic Colorectal Cancer biomodulation Group" Abstr LBA20, Congreso ESMO 2010.
271. Vandesompele, J. et al.: "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes". *Genome Biol* 7 (2002); 7: RESEARCH0034.
272. Ueno, H., Mochizuki, H. and Hatsuse K. "Indicators for treatment strategies of colorectal liver metastases". *Ann Surg.* 231.1 (2000): 59-66.
273. Van Cutsem et al. "Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases". *Eur J Cancer.* 42 (2006): 2212-2221.
274. Van Cutsem, E. et al. "Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer." *N.Engl.J.Med.* 360.14 (2009): 1408-17.
275. Van Cutsem, E. et al. "Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer." *J.Clin.Oncol.* 25.13 (2007): 1658-64.
276. Van Cutsem, E. et al. "Randomized phase III trial comparing infused irinotecan /5 fluorouracil/folinic acid versus 5 FU/FA in stage III colon cancer patients. PETACC3. *J Clin Oncol* 16S (2005)
277. Vogelstein, B. et al. "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N.Engl.J.Med.* 319.9 (1988): 525-32.
278. Wang, J. et al. "Lymph node ratio: role in the staging of node-positive colon cancer." *Ann.Surg.Oncol.* 15.6 (2008): 1600-08.
279. Weber, SM. et al. "Survival after resection of multiple hepatic colorectal metastases". *Ann Surg Oncol* 7 (2000): 643-50.
280. Weinstat-Saslow, D. L. et al. "Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis." *Cancer Res.* 54.24 (1994): 6504-11.

281. Weisenberger, D.J. et al. "CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer". *Nat. Genet.* 38.7 (2006): 787-93
282. Wilentz, R. E. et al. "Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression." *Cancer Res.* 60.7 (2000): 2002-06.
283. Willett, C. G. et al. "Does postoperative irradiation play a role in the adjuvant therapy of stage T4 colon cancer?" *Cancer J.Sci.Am.* 5.4 (1999): 242-47.
284. Wolmark, N. et al. "The prognostic significance of preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal cancer. Results from NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) clinical trials." *Ann.Surg.* 199.4 (1984): 375-82.
285. Wong, W. M. et al. "Histogenesis of human colorectal adenomas and hyperplastic polyps: the role of cell proliferation and crypt fission." *Gut* 50.2 (2002): 212-17.
286. Woodford-Richens, K. L. et al. "SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98.17 (2001): 9719-23.
287. Ychou, M. et al. "Randomized phase III trial comparing infused 5-fluorouracil/folinic acid (LF5FU) versus LV5FU + irinotecan (LV5FU + irinotecan) as adjuvant treatment after complete resection of liver metastases from colorectal cancer (LMCRC). (CPT-GMA-301). " *J. Clin. Oncol.* 26 (2008): (Abstr LBA 4013).
288. Yoong, K. F. and D. H. Adams. "Interleukin 2 restores CD3-zeta chain expression but fails to generate tumour-specific lytic activity in tumour-infiltrating lymphocytes derived from human colorectal hepatic metastases." *Br.J.Cancer* 77.7 (1998): 1072-81.
289. Yoong, K. F. and D. H. Adams. "Tumour infiltrating lymphocytes: insights into tumour immunology and potential therapeutic implications." *Clin.Mol.Pathol.* 49.5 (1996): M256-M267.
290. Yoong, K. F. et al. "Fas/Fas ligand interaction in human colorectal hepatic metastases: A mechanism of hepatocyte destruction to facilitate local tumor invasion." *Am.J.Pathol.* 154.3 (1999): 693-703.
291. Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, and E. Roos. "The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases." *Cancer Res.* 63.13 (2003): 3833-39.
292. Zeng, Z. S. and J. G. Guillem. "Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastases." *Br.J.Cancer* 72.3 (1995): 575-82.